Experimentaluntersuchungen der fibrinolysehemmenden Wirkung von Epsilon-Amino-n-Capronsäure und Organinhibitoren

von

KLAUS HENNIG

München 1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0017

Aus der 1. Med. Klinik der Universität München
Direktor : Professor Dr. H. Schwiegk

Experimentaluntersuchungen der fibrinolysehemmenden Wirkung von Epsilon-Amino-n-Capronsäure und Organinhibitoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfasst und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von

Klaus Hennig
aus
Greiz

München
1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Professor Dr. R. Marx
Mitberichterstatter : Professor Dr. H. Schwiegk
Dekan : Professor Dr. W. Seitz
Tag der mündlichen Prüfung : 26.6.1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 2

Apparaturen und Substanzen 4

Methodik 6

- Allgemeines 6
- Fibrinolyse-und Fibrinogenolysebestimmungen 11
- Vergleichende Betrachtung der Teste,ihr Aussagewert und ihre Fehlerbreite 24

Untersuchungen in vitro 36

- Gerinnungszeiten und ihre Veränderung im Verlauf der Untersuchungen 36
- Fibrinolyse,Aktivierung und Hemmung 39
  - Physikalische und apparative Faktoren 39
  - Einfluss der Proteolytika 41
  - Einfluss der Inhibitoren 47
- Einfluss der Antikoagulantien auf Gerinnung und Fibrinolyse 67
- Fibrinogenolyse,ihre Bestimmung und ihre Beeinflussung durch Epsilon-Amino-n-Capronsäure und Organinhibitoren 79
- Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Epsilon-Amino-n-Capronsäure und Organinhibitor (Trasylol) 86

Untersuchungen in vivo 1o1

- Zur Durchführung der Tierversuche 1o1
- Proteolytika und Inhibitoren in vivo 1o3
- Bestimmung der Verweildauer der aktiven Inhibitoren in der Blutbahn 112

Diskussion 128

Zusammenfassung 13o

Verzeichnis der Abkürzungen 132

Literaturverzeichnis 134

Einleitung

Die Fibrinolyse, der proteolytische Abbau von Fibrin, ist in vitro und in vivo beobachtbar (Lit. 1;2) und kann durch indirekte (Lysokinasen = Streptokinase, Urokinase) und direkte (Plasmin = Fibrinolysin) Proteolytika beschleunigt oder durch eine Vielzahl von Inhibitoren (Lit. 1;3;4) gehemmt werden.

Zustände gesteigerter Proteolyse kommen in der Klinik als Komplikationen in Chirurgie, Gynäkologie und bei schweren Allgemeinerkrankungen vor (Lit. 6) und können durch intravasalen Fibrinogenabbau zur Afibrinogenaemie und damit zur Ungerinnbarkeit des Blutes führen.
In derartigen Fällen wären, neben Blut-und Fibrinogenersatz, wirksame Fibrinolyse-Inhibitoren kausal-therapeutisch notwendig.

Bisher allerdings geht die therapeutische und prophylaktische Anwendung von Proteinase-Inhibitoren bei Zuständen gesteigerter Fibrinolyse - auch nach Einführung der Kallikrein-Inaktivatoren in die Therapie von organ - ständigen Proteinase-Intoxicationen (Lit. 5) - über einzelne Versuche nicht hinaus (Lit. 7;8;9).
Angaben in der neueren Literatur lassen jedoch Epsilon-Amino-n-Capronsäure (ACS) und die aus tierischen Organen hergestellten Kallikrein-Inaktivatoren (Organinhibitoren) für eine solche therapeutische Verwendung aussichtsreich erscheinen.

Epsilon-Amino-n-Capronsäure (ACS), eine aminierte Fettsäure mit 6 C-Atomen, wird im anglo-amerikanischen Schrifttum als Ipsilon oder ACA (= Epsilon-Amino-Caproic - Acid) bezeichnet.

ACS hemmt Trypsin,Plasmin (= Fibrinolysin) und die Plasminogen-aktivierung durch Lysokinasen (Lit. 1o;11; 12;13;27). Die Hemmwirkung auf streptokinase-induzierte Hyperfibrinolyse wurde in vivo (Kaninchen) nachgewiesen (Lit. 14).
Die Verträglichkeit ist gut. Peroral werden von der Ratte 5oo mg freie Säure vertragen, während beim Kaninchen Mengen von 1,5 g/kg subcutan tödlich sind.(Lit.28)

Die Kallikrein-Inaktivatoren finden sich in den verschiedensten Organen (Lit. 15). Zur Behandlung von Pankreasaffektionen ist ein Kallikrein-Inaktivator aus tierischen Drüsen im Handel (Trasylol Bayer). Es handelt sich um ein Polypeptid vom Molekulargewicht von 11600-11700. Neben der Fähigkeit Kallikrein zu inaktivieren ist die antiproteolytische Eigenschaft dieser Substanz beschrieben , wobei eine hemmende Wirkung für Plasmin (Marx,Werle), für Trypsin, Chymotrypsin (Werle,Appel), nicht dagegen für Pepsin bekannt ist. Der Kallikrein-Inaktivator selbst wird durch diese Fermente nicht angegriffen (Lit. 15;16;29;3o).

In der vorliegenden Arbeit werden in vitro, in vivo und am Thrombelastogramm

1) die antifibrinolytische Wirkung von Epsilon-Amino-n-Capronsäure und von Kallikrein-Inaktivatoren (Organinhibitoren) überprüft und verglichen,
2) Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus und zur antifibrinogenolytischen Wirkung beider Inhibitoren durchgeführt,
3) der Einfluss von Antikoagulantien auf die Fibrinolyse untersucht,
4) die Inaktivierung der Inhibitoren in vivo bestimmt.

Apparaturen und Substanzen

Apparaturen

1) Thermostat nach J. Jürgens
2) Thrombelastograph nach Hartert
3) Zentrifuge bis 2000 Um/Min
4) Uhlenhuthröhrchen

Substanzen

1) Antikoagulantien
   a) Alpha-Heparin (Heparin-Novo 5000 I. Einh/ccm)
   b) Heparinoid G 31 150 Geigy 10 %
2) Calciumchlorid-Lösung
   a) mol / 40
   b) 1,29 % Calc. chlor. anh.
3) Essigsäure 1 %
4) Fibrinogen
   a) Humanfibrinogen (Behringwerke)
   b) Rinderfibrinogen (Behringwerke) 60 mg/Röhrchen
5) Humanalbumin (Behringwerke)
6) Inhibitoren
   a) Epsilon-Amino-n-Capronsäure (L.Light und Co.)
   b) Organinhibitoren
      I. Parotis-inhibitor (Trasylol) Bayer.
         1000 Kallikreininhibitoren-Einheiten
         (K.I.Einh.) pro ccm
      II. Lungeninhibitor 45 000 K. I. Einh/g
         Das Präparat wurde uns freundlicherweise
         von Herrn Prof. Dr. E. Werle aus der
         Chirurgischen Klinik überlassen.
7) Natriumcitratlösung 3,8 % steril

8) Physiologische Kochsalzlösung

9) Protaminsulfat (Protamin "Roche" 5 %)

10) Proteolytika
   A) Direkte
      a) Plasmin (Behringwerke)
         I. SK-aktiviert 25 mg / Ampulle
         II. Plasmin 70 mg / Ampulle
   B) Indirekte
      a) Bistreptase 20 000 SK-Einh. + mindestens 5000 SD-Einh./Ampulle (Behringwerke)
      b) Varidase (Lederle) 20 000 SK-Einh. + mindestens 5000 SD-Einh./Ampulle.

11) Paraffinum liquidum

12) Puffer pH 7,6 und 6,7
   Diaethylbarbitursäure-Pufferlösung (Behringwerke)

13) Thrombin
   a) Test-thrombin 60 NIH-Einh/Ampulle (Behringwerke)
   b) Topostasin 30 000 NIH-Einh/Ampulle (Hoffmann-La Roche).

Methodik

I. Allgemeines

A) Aufbewahrung der Substanzen.

Die verwendeten Substanzen wurden bei + 4° oder bei - 20° Celsius gelagert.
Alle Verdünnungen wurden mit phys. Kochsalzlösung hergestellt und an jedem Versuchstag jeweils frisch bereitet. Unbeständige Fermentlösungen (Heparin- Thrombin- Proteolytika-lösungen) wurden während des laufenden Versuches im Eis-Wasser-bad aufbewahrt.

B) Pipettierung.

Zum Pipettieren wurden Ausblaspipetten von 0,10 und 0,20 ccm und Auslaufpipetten von 1,0 und 10,0 ccm verwendet. Die verschiedenen Ansatzkomponenten wurden - einzeln oder gemischt - während der gesamten Versuchsdurchführung mit jeweils besonderen Pipetten zusammengegeben.

C) Allgemeine Versuchsdurchführung.

Uhlenhuthröhrchen wurden aus Zimmertemperatur in den Thermostaten (37° C) eingesetzt und anschließend in schneller Reihenfolge die Ansatzkomponenten zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass miteinander reagierende Substanzen so spät als möglich gemischt wurden. Zur gleichmäßigen Durchmischung des Ansatzes wurde die letzte Ansatzkomponente kräftig eingeblasen. Hierdurch wurde die gleichmäßige Gerinnselbildung gesichert, die eine Voraussetzung für eine optimale Lysiszeitbestimmung ist.
Während der gesamten Überwachungsdauer wurden die Ansätze bei 37° C im Thermostaten oder im Brutschrank aufbewahrt.

D) Zeitenbestimmung.

a) Gerinnungszeit:
Als Gerinnungszeit wurde die Zeitspanne von Zugabe der letzten für die Gerinnselbildung notwendigen Ansatzkomponente bis zum Gerinnungseintritt in Sekunden bestimmt. Der Gerinnungseintritt wurde folgendermaßen festgestellt:

1) Bei kurzen Gerinnungszeiten bis etwa 20 sec (z. B. nach Thrombinzusätzen) wurde nach Zugabe der letzten Ansatzkomponente mit der Pipette leicht in den Ansatz geblasen, sodass kleine Luftbläschen in der quirlenden Flüssigkeit mitgerissen wurden. Die Bewegung dieser Luftbläschen wurde beobachtet und deren abrupter Bewegungsabbruch als Eintritt der Gerinnung, Abschluss der Gerinnungszeit und Beginn der Lysiszeit gestoppt.

2) Bei längeren Gerinnungszeiten wurde, unter ständiger Beobachtung des Ansatzes, das Auftreten einer deutlichen und gut sichtbaren Trübung als Eintritt der Gerinnung gewertet. Der Grad dieser Trübung ist weitgehend abhängig von der Gerinnseldichte, also der gebildeten Fibrinmenge. Indirekte Beleuchtung und Betrachtung gegen dunklen Hintergrund sind zur sicheren Wahrnehmung nötig.

Wenn die optische Gerinnungszeitbestimmung auch ungenau erscheint, so wurde sie gegenüber den Methoden vorgezogen, bei denen mechanische Eingriffe (z.B. Schütteln oder das Durchziehen eines Drahthäkchens = Häkchenmethode nach Marx) zur Verdeutlichung der ersten Gerinnselbildungen herangezogen werden. Die optische Methode hat den Vorteil, dass durch keinerlei mechanische Manipulationen die gleichmäßige Gerinnselbildung gestört wird, wodurch eine Voraussetzung für eine möglichst genaue Lysiszeitbestimmung geschaffen ist. Außerdem wird hierbei der Gerinnungseintritt des gesamten Ansatzvolumens erfasst und nicht, wie z. B. bei der Häkchenmethode, das

Auftreten der ersten Fibrinfäserchen, die sich häufig in der Grenzschicht zwischen Luft, Ansatzoberfläche und Glaswand vor dem allgemeinen Gerinnungseintritt im Gesamtansatz bilden.

Nicht verwendbar ist die optische Gerinnungszeitbestimmung immer dann, wenn die entstehenden Fibrinmengen nicht ausreichen, um einen deutlich wahrnehmbaren Trübungsgrad herbeizuführen. Das ist der Fall, einmal bei geringen Fibrinogenansatzkonzentrationen (z. B. nach starker Fibrinogenolyse), weiterhin bei starker Fibrinolyse, die das entstehende Fibrin sofort wieder auflöst, und nach Zusatz höherer Heparinkonzentrationen zum Ansatz. Bei Versagen der optischen Methode wurde das Auftreten des ersten Gerinnsels als Abschluss der Gerinnungszeit registriert.
Zur Sichtbarmachung eines feinen Gerinnselnetzes wurde leicht an das Uhlenhuthröhrchen mit dem Finger getippt, und beim Auftreten einer sich durch den Röhrcheninhalt fortpflanzenden Trübungswelle auf das Vorhandensein eines zusammenhängenden Fibrinnetzes geschlossen. Voraussetzung war auch hier indirekte Beleuchtung und Betrachtung gegen dunklen Hintergrund.

b) Lysiszeit:
Als Lysiszeit wurde die Zeitspanne von eingetretener Gerinnung (Bestimmung s. o.) bis zur vollständigen Auflösung des Gerinnsels in Minuten oder Stunden angegeben.

Die genaueste Bestimmung der vollständigen Gerinnsellysis sehen wir in der Registration des Zeitpunktes, zu dem die im Gerinnsel eingeschlossenen Luftbläschen beginnen, infolge Verflüssigung des Ansatzes, an die Oberfläche aufzusteigen. Leider treten die Luftbläschen nur in den schnell gerinnenden Ansätzen nach Thrombinzusatz auf. (FTF, Euglobulinlysistest.)

Eine Lysiszeitbestimmung nach der optischen Methode (s. Gerinnungszeitbestimmungen), wobei das Verschwinden der bei Gerinnungseintritt entstandenen Trübung registriert wird, ist nicht möglich, da auch nach der weitgehenden Klärung des Ansatzes immer noch ein feines, zusammenhängendes Fibrinnetz vorhanden ist. Die Abnahme der Trübung also kann nur als Hinweis auf die bald eintretenden Totallysis gewertet werden. Vollständige Fibrinauflösung wurde angenommen, wenn die Kontinuität eines Gerinnsels nicht mehr nachweisbar war, so dass sich bei leichten Erschütterungen keine Fibrinverklumpungen mehr zeigten und die beim Schütteln mitgerissenen Luftbläschen in kontinuierlicher Bewegung an die Oberfläche steigen konnten. Der gelöste Ansatz konnte dabei glasklar oder, besonders nach langen Lysiszeiten, trübe sein. Verschiedentlich zerfiel ein Gerinnsel bei leichter Erschütterung in kleine Flöckchen (= flockiger Zerfall) sodass, obwohl noch kleine Gerinnselteilchen sichtbar waren, die Kontinuität des Fibrinnetzes aufgehoben war. In solchen Fällen wurde der Zeitpunkt der Erschütterung des Ansatzes als Abschluss der Fibrinolyse registriert und die gemessenen Zeiten mit dem Hinweis fl = flockiger Zerfall versehen.

E) Versuchsfolge.

Die Durchführung unterteilte sich in 3 Abschnitte

1) Vorbereitung
2) Versuchsdurchführung: Zeit von Beginn der ersten bis zu Beginn der letzten Lysiszeitbestimmung innerhalb einer Versuchsreihe.
3) Überwachung der Lysiszeiten.

Während des Abschnittes "Versuchsdurchführung" lief ständig eine Stoppuhr S_1, die zu Beginn und am Ende der Durchführung mit der Tageszeit verglichen wurde. Die Beziehungen der Zeitangaben auf S_1 und der Tageszeit waren

damit festgelegt. Für jeden einzelnen Ansatz wurde mit Zugabe der letzten für die Gerinnung notwendigen Komponente auf einer 2. Stoppuhr S_2 die Gerinnungszeit, gleichzeitig aber auf S_1 die Dauer der bisherigen Versuchsdurchführung registriert. Mit Gerinnungseintritt wurden durch eine 3. Stoppuhr S_3 die Lysisvorgänge innerhalb der ersten 15 Minuten überwacht. Lysiszeiten über 15 Minuten konnten während der Versuchsdurchführung mit S_1, längere Zeitabschnitte nach der Tageszeit bestimmt werden.
Die Lysiszeit ergab sich aus den Größen

T = Zeitspanne von Beginn der "Versuchsdurchführung" bis zur Feststellung der völligen Auflösung.

S = Wert auf Stoppuhr S_1 zu Beginn der Gerinnungszeitbestimmung des jeweiligen Ansatzes.

G = Gerinnungszeit.

$$\text{Lysiszeit} = T - (S + G)$$

Auf diese Weise war es möglich, stündlich bis etwa 25 Ansätze auszuführen.

Ansätze mit langen Lysiszeiten wurden durchschnittlich 2 Stunden unter ständiger Sichtkontrolle im Thermostaten, danach mit Paraffin überschichtet und verkorkt im Brutschrank bei 37° C aufbewahrt. Die weitere Überwachung der Ansätze konnte aus technischen Gründen nur in zeitlich unregelmäßigen Abständen durchgeführt werden. Sie wurden über 24 - 80 Stunden kontrolliert. Die Überwachung wurde abgebrochen bei Pilzbefall, oder wenn eine weitere Kontrolle das Versuchsergebnis prinzipiell nicht mehr verändern konnte. War eine kontinuierliche Überwachung nicht möglich, so wurde die Zeitspanne, innerhalb der die Auflösung eintrat, angegeben.

II. Fibrinolyse-und Fibrinogenolysebestimmung.

A) Methoden zur Fibrinolysebestimmung.

a) Vorbemerkung

1) Bei den verwendeten Plasmen handelte es sich ,falls nicht anders vermerkt, immer um Plasmamischungen, Diese wurden aus mehreren prothrombin-normalen Citratblutproben (1 Teil 3,8 % Natriumcitratlösung + 4 Teile Venenblut) hergestellt, wobei die einzelnen Blutproben zwischen 1-8 Stunden vor ihrer Verwendung bei Zimmertemperatur gestanden hatten.

2) Die Abtrennung der zellulären Elemente erfolgte durch Abzentrifugieren 1o Minuten bei 1500 Um/Min. Das gewonnene Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

3) Abkürzungen und Benennungen der Teste wurden nach den wesentlichsten Ansatzkomponenten gewählt. Den Abkürzungen wurden zur genaueren Bezeichnung der verwendeten Substanzen Ergänzungen vorangestellt. Z.B. Testabkürzung: PSVF und Hasen-PSVF, wobei im letzten Falle ausgedrückt werden soll, dass der PSVF-Ansatz statt mit menschlichen nur mit Kaninchen-Plasma -und Serum durchgeführt wurde.

b) Fibrinolyseteste.
(Die Ansatzkomponenten sind in Reihenfolge der Zugabe aufgeführt).

1) Recalcifizierungs-Visueller-Fibrinolysetest
(Entnommen der Veröffentlichung s.Lit. 17)

0,06 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
0,10 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Zusätze, gelöst in phys. Kochsalzlsg.
Unter Zusätzen sind Inhibitoren,Antikoagulantien, Proteolytika und Thrombin verstanden.

0,20 ccm Humancitrat-mischplasma.

Eine Verbesserung dieser Methode sehen wir aus den weiter unten dargelegten Gründen im folgenden Test.

2) Plasma-Serum-Visueller-Fibrinolysetest (PSVF)

0,04 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
0,10 ccm Serum 1:1 (1 Teil Citratplasma + 1 Teil $CaCl_2$ mol / 40)
0,12 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,10 ccm Human-citrat-mischplasma.

Abwandlungen.

a) Tier-PSVF (= Tier-Plasma-Serum-Visueller-Fibrinolysetest)
Der Ansatz wurde in gleicher Anordnung wie der PSVF ausgeführt, wobei lediglich statt menschlichen, tierisches Citratplasma und Serum verwendet wurde.

b) Misch-PSVF (= Misch-Plasma-Serum-Visueller-Fibrinolysetest)
Hierbei sind im Ansatz sowohl menschliches als auch tierisches Plasma enthalten,

0,05 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
0,06 ccm menschliches Serum 1:1
0,05 ccm phys. Kochsalzlösung oder Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,10 ccm Human-citrat-plasma 1:5
0,10 ccm Tier-citrat-plasma 1:5

3) Fibrinogen-Thrombin-(Visueller)-Fibrinolysetest = FTF
(Nach Ferguson, modifiziert. Entnommen Lit. 17)
Hier wurde gereinigtes Human= oder Rinderfibrinogen zur Herstellung eines Gerinnsels verwendet.

0,12 ccm Barbitursäure-Puffer pH 7,6
0,015 ccm Human-citrat-plasma 1:5
0,12 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,08 ccm Fibrinogen-phys. Kochsalzlsg. 1,5 %
0,025 ccm Thrombinlösung 60 NIH-Einh. / ccm.

4) Euglobulinlysistest
(In Anlehnung an Veröffentlichung s. Lit. 18)
Das Mehrfache von

1,0 ccm Humancitrat-plasma 1:5
16,0 ccm Aqua dest.
0,3 ccm Essigsäure 1 %

wird zusammengegeben. 17,3 ccm dieser Mischung, entsprechend 1 ccm Plasma, wurde in ein Zentrifugenglas einpipettiert und mindestens 1 Stunde zur Ausfällung der Euglobuline im Kühlschrank (+ 4° C) belassen.

Der Niederschlag wurde 5 Min. bei 1500 Umdrehungen / Min. abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Glas bis zur weiteren Verwendung des Niederschlages mit der Öffnung nach unten auf Filtrierpapier bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Der Niederschlag wurde im Original-Plasmavolumen mit Barbitursäurepuffer pH 7,6 aufgelöst und im folgendem Ansatz verwendet.

0,05 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
(Bei Verwendung von Thrombin wurde 0,01 ccm durch Topostasin 200 NIH-Einh / ccm ersetzt, wobei das Thrombin dem Ansatz als letzte Komponente zugeführt wurde.)
0,20 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,10 ccm Euglobulin-Pufferlösung.

B) Methoden zur Fibrinogenolyse-bestimmung.

In diesen Ansätzen wurde das Fibrinogen als Substrat für die Proteolytika verwendet.

Ausgeführt wurden diese Bestimmung

a) im FTF (s. o.)

b) im Euglobulin-test mit Thrombinzusatz (s.o.).

In beiden Methoden wurde ein Vielfaches (10 x) der Einzelansatzmengen, außer Proteolytikum und Koagulantien in einem Reagenzglas zusammengegeben. Nach Wärmeausgleich (37° C), Zusatz des Proteolytikum zum Großansatz. Mit zunehmenden Inkubationszeiten wurde dieser Mischung 0,335 ccm (FTF) bzw. 0,30 ccm (Euglobulinlysistest) entnommen und in vorgewärmten Uhlenhuthröhrchen durch die Koagulantien zur Gerinnung gebracht. (Näheres siehe Abschnitt Fibrinogenolyse und Inhibitoren (S.79).

III. Fibrinolyse im Thrombelastogramm (TEG).

A) Ansätze:

1) Nativblut- Thrombelastogramm (siehe Tierversuche)

2) Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel. (Entspricht weitgehend dem FTF-Ansatz.)

0,10 ccm Barbitursäure-puffer pH 7,6
0,015 ccm Human-citrat-plasma 1:5
0,10 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,20 ccm Fibrinogen-Lösung (in phys. Kochsalzlsg.) 1,5 %
0,025 ccm Thrombin 60 NIH-Einh. / ccm

3) TEG-P_{16}SF. Dieser Ansatz entspricht weitgehend dem PSVF. Die verwendete Plasmamenge ist auf Kosten des Serumzusatzes auf 0,16 ccm erhöht.

0,05 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
0,04 ccm Serum 1:1
0,11 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,16 ccm Citratplasma 1:5

B) Theoretisches.

Das Thrombelastogramm stellt die photokymographische Aufzeichnung der Gerinnselelastizität dar. Alle Aussagen über Gerinnungs= oder Lysisvorgänge können nur aus dem mechanischen Verhalten des Gerinnsels gewonnen werden. Die Bestimmung erfolgt im Thrombelastograph nach Hartert.
Eine oben offene Stahlküvette, die den zur Gerinnung zu bringenden Ansatz enthält, wird durch einen Bewegungsmechanismus um einen bestimmten Winkel um ihre senkrechte Achse hin= und hergedreht. Ein Stift, dessen Längsachse in der Verlängerung der Drehachse der Küvette verläuft, wird in letztere so eingeführt, dass ein genormter Abstand zwischen Stift und Küvettenwandung eingehalten wird. Die Drehbewegung kann nur dann auf diesen Stift übertragen werden, wenn durch das entstandene Gerinnsel eine Verbindung zwischen Küvette und ihm hergestellt ist. Registriert wird photokymographisch die Drehbewegung des Stiftes. Da dieser torsionselastisch gelagert ist, setzt er steigenden Ausschlägen einen wachsenden Widerstand entgegen. Das bedeutet, dass - je dehnbarer, also unelastischer - (wobei unter Elastizität die Körpereigenschaft verstanden wird, auf verformende Kräfte mit Gegenkräften zu antworten) das Gerinnsel ist, um so geringer ist der Stempelausschlag und damit die aufgezeichnete Amplitude a.
Die messbare TEG-Breite ist also ein Ausdruck für die Gerinnselelastizität, wobei zwischen Amplitude und Elastizität m_e folgende Beziehung besteht.

$$m_e = \frac{100\ a}{100 - a}$$

C) Durchführung.

In die angewärmte Apparatur wurde die Küvette eingesetzt, die Ansatzkomponenten in schneller Reihenfolge einpipettiert und mit der Registrierung begonnen. Die Durchmischung des Ansatzes wurde durch kräftiges Einblasen der letzten Ansatzkomponente, bei längeren Gerinnungszeiten durch zusätzliches dreimaliges Heben und Senken des Stempels, gewährleistet. Durch dieses Vorgehen konnte die Einfüllzeit (E), also die Zeitspanne zwischen Zugabe der letzten Ansatzkomponente und Registrationsbeginn, relativ gering und konstant erhalten werden.
Die im folgenden angegebenen Reaktionszeiten R (in Minuten) sind die Zeiten von Beginn der Registrierung bis zu dem Zeitpunkt, an dem das TEG einen Kurvenausschlag von 1 mm erreicht.

D) Beurteilung des Thrombelastogramm unter besonderer Berücksichtigung der Fibrinolyse-vorgänge.

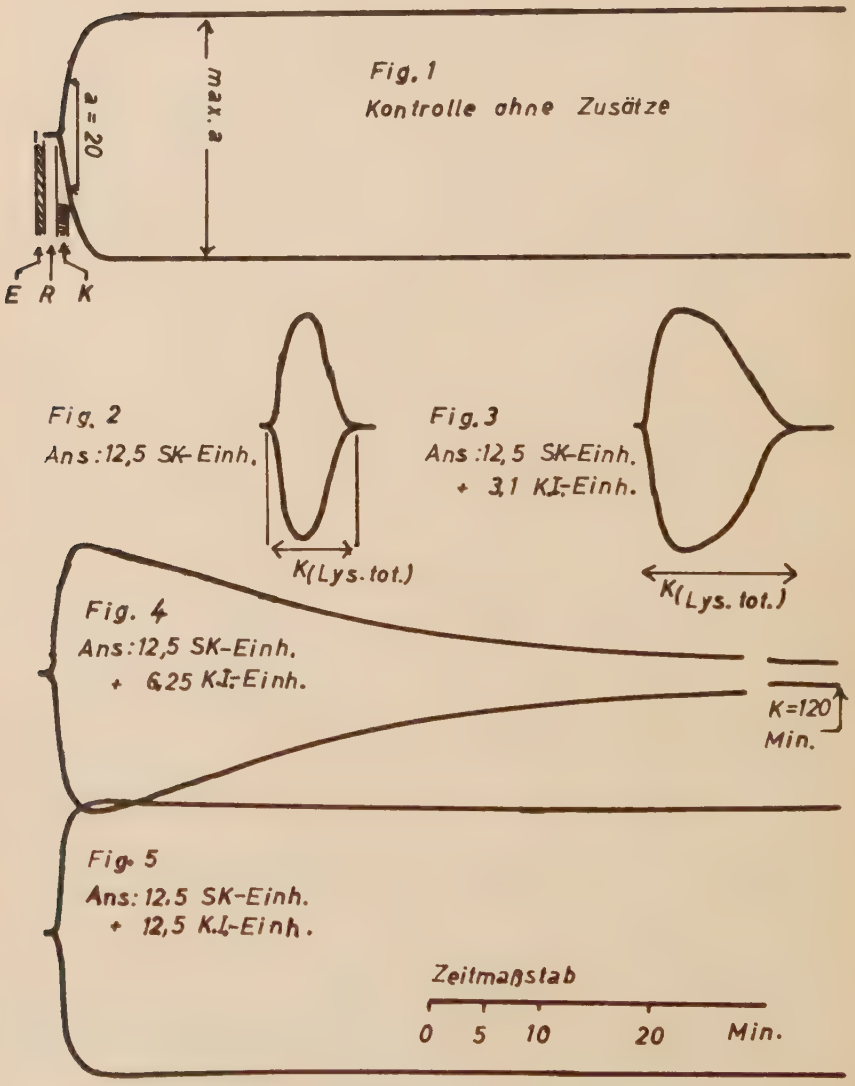
In der nachfolgenden Abbildung 1 sind einige der gebräuchlichsten TEG-Größen eingezeichnet. Die dargestellten TEG-Pausen sind am Thrombin-Fibrinogen-Gerinnsel (s.o.) gewonnen und zeigen den Einfluss steigender Lungeninhibitorenmengen (3,13; 6,25; 12,5 K.I.E) auf die durch 12,5 SK-Einheiten (Bistreptase) im Ansatz hervorgerufene Fibrinolyse.

Die in Abb. 1 eingezeichneten Größen bedeuten.

E = Einfüllzeit = Zeitspanne in Minuten von Zusatz der letzten für die Gerinnung notwendigen Ansatzkomponente bis zum Beginn der Registrierung.

Abb. 1 TEG - PAUSEN

Einfluss steigender KJ. - Einh. Organinhibitor auf SK - induzierte Fibrinolyse im Rinder-Fibrinogen - Thrombin - Gerinnsel.



R = Reaktionszeit = Zeit in Minuten von Registrationsbeginn bis zu einer Kurvenverbreiterung von 1 mm.

K = Zeitspanne in Minuten, die nach abgeschlossener Reaktionszeit bis zum Erreichen einer Amplitude von 20 mm verstreicht.

$K_{(\text{mit Index})}$ = Zeiten in Minuten von Abschluss der Reaktionszeit bis zu der durch den Index angegebenen Grenze.

$K_{(\text{Lys.tot.})}$ = Zeitspanne nach abgeschlossener Reaktionszeit bis zur totalen Auflösung des Gerinnsels.

a = Amplitude = Entfernung in mm der TEG-Schenkel voneinander, gemessen vom äußeren Rand des oberen bis zum inneren Rand des unteren Kurvenschenkels.

max.a = maximale Amplitude in mm.

Aus Abbildung 1 Fig. 2, 3, 4 gehen die typischen fibrinolysebedingten Veränderungen an den TEG-Kurven hervor. Nach Erreichen einer maximalen Amplitude nähern sich die beiden Kurvenschenkel mehr oder weniger schnell, um sich bei totaler Fibrinolyse wieder zu vereinigen.

Es wurde versucht, eine Größe zu finden, die die Veränderungen der Lysis-intensität in Versuchsreihen zahlenmäßig erfassen kann. Hierfür kommen in Frage.

a) Die Zeit bis zur völligen Auflösung = $K_{(\text{Lys. tot.})}$

b) Die Fläche, die in den zu vergleichenden TEG-ableitungen innerhalb gleicher Zeitspannen nach abgeschlossener Reaktionszeit von den Kurvenschenkeln umschlossen wird.

c) Die maximale Amplitude.

d) Die maximale Abnahmegeschwindigkeit der Amplitude = V_a

Charakteristisch für die Lysisvorgänge im Thrombelastogramm ist der Amplitudenabfall mit zunehmender Registrationsdauer. Bestimmt man den Betrag der Amplitudenabnahme (A) in Millimetern und die zugeordnete Zeitspanne (T) in Minuten, so läßt sich die Amplituden-Abnahmegeschwindigkeit als Quotient aus A : T errechnen und in mm/Min angeben.

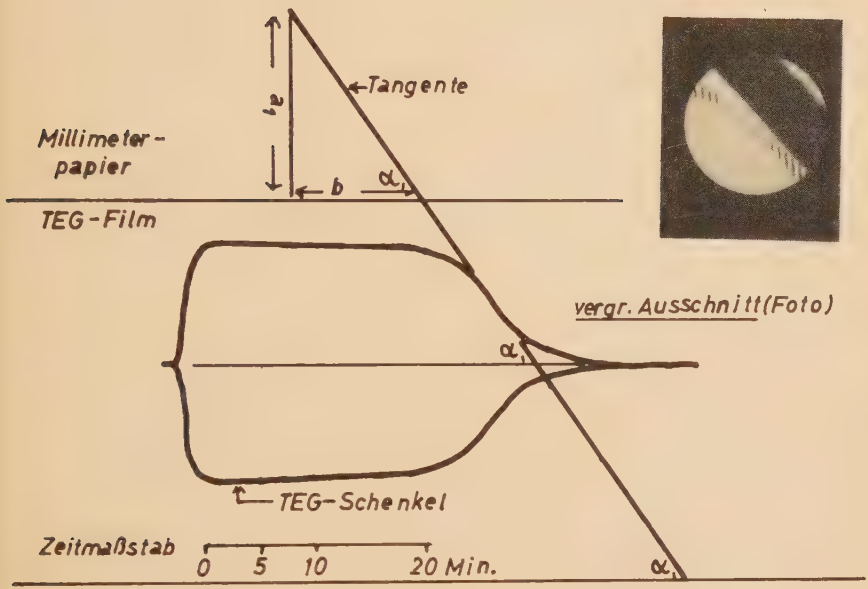
Während der Gerinnselauflösung erfolgt aber der Amplitudenabfall keineswegs linear, (s. z. B. Abb. 1 und 10) das bedeutet, dass die Größe der Amplituden-Abnahmegeschwindigkeit ständig wechselt.

Im folgenden wurde versucht, den größten bestimmbaren Wert der Amplituden-Abnahmegeschwindigkeit = V_a zur zahlenmäßigen Erfassung von Veränderungen der Lysisintensität heranzuziehen. V_a errechnet sich als Summe der Größen G_1 und G_2. G gibt an, um wieviel Millimeter pro Minute sich ein TEG-Schenkel der Nullinie des Thrombelastogramms nähert. Es wird im Bereich des stärksten Amplitudenabfalls für den oberen TEG-schenkel als G_1 und als G_2 für den unteren Schenkel folgendermaßen bestimmt (s. auch Abb. 2).

Der Film mit der auszuwertenden TEG-Kurve wurde auf Millimeterpapier so aufgeheftet, dass der Filmrand parallel zur Grundlinie der Millimeterfelderung zu liegen kam. Unter Lupenbetrachtung wurde am steilsten Kurvenstück mit einem geeigneten Lineal die Tangente angelegt und ihre Verlängerung auf dem Milimeterpapier aufgezeichnet.

Das beigefügte Photo in Abbildung 2 zeigt in vergrößertem Maßstab das Anlegen der Tangente an den TEG-schenkel, der bogenförmig durch die linke Bildhälfte zieht. Die einzelnen Lichtmarkierungspunkte des TEG-schenkels sind deutlich sichtbar.

Abb. 2 Bestimmung von „G" an TEG-Figuren.



$$tg\,\alpha_1 = \frac{a_1}{b}$$

$$G = 2x\ tg\,\alpha_1$$

Der tangenten-bildende Rand des Lineals durchzieht die rechte, obere Bildhälfte.

Auf dem Millimeterpapier ließ sich das Steigungsmaß der Tangente bestimmen.

$$m \text{ (Steigungsmaß)} = tg.\alpha_1 = \frac{a_1}{b}$$

Da der Film pro Minute um 2 Millimeter vorwärtsrückt, ist b = 2 t (t gibt die Zeit in Minuten an), somit ist

$$m = tg\alpha_1 = \frac{a_1}{2t}$$

Setzt man für den Quotient $a_1 : t = G$ so ist

$$m = tg\alpha_1 = \frac{G}{2}$$

oder $G = 2 \times tg\alpha_1$

Addiert man die Werte von G_1 und G_2 (G des oberen und unteren TEG-schenkels) so ergibt die Summe (V_a) die maximale Amplituden-Abnahmegeschwindigkeit.

$$V_a = G_1 + G_2 = 2 \times (tg\alpha_1 + tg\alpha_2)$$

V_a, die maximale Amplitudenabnahmegeschwindigkeit, gibt in Millimetern den Höchstbetrag an, um den sich im Verlauf der Auflösung die Amplitude des Thrombelastogramms pro Minute verringert.

Die Zeitspanne, während der V_a am TEG messbar ist, kann durch die Zahl der Lichtpunkte bestimmt werden, die zur Festlegung der Tangente verwendet werden. (s. Photo Abb. 2) Der Lichtzeiger der Apparatur benötigt für eine vollständige Hin- und Herbewegung zwischen den Maximalausschlägen, konstant und unabhängig von der Größe der Amplitude, 9 sec. d. h. dass beispielsweise der Lichtzeiger alle 9 sec. einen Markierungspunkt innerhalb des oberen TEG-schenkels setzt. 10 aufeinanderfolgende Markierungspunkte eines TEG-schenkels entsprechen also einer Registrationsdauer von 1,5 Minuten.

Die vier TEG-Größen erscheinen geeignet für die zahlenmäßige Erfassung von Veränderungen der Lysisintensität. Das prinzipielle Verhalten der einzelnen Größen zeigt Tab. 1. Die hier angegebenen Werte sind aus den Figuren 1 - 5 der Abbildung 1 gewonnen.

Tabelle 1 zeigt Veränderungen der Fibrinolyse-intensität nach Lungeninhibitorzusatz zum Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel (mit 12,5 SK-Einh./Ans.) an Hand vier verschiedener Messgrößen des TEG. (s. Abb. 1 Fig. 1 - 5)

Fig. Nr.	SK-Einh. im Ans.	K.I.Einh. Lungen-inh.im Ans.	max.a. (mm)	Fläche cm^2 in 120 Min	V_a mm/Min.	$K_{(Lys.tot.)}$ Min.
1	0	0	50	110	kl 0,4	gr 120
2	12,5	0	42	3,6	20,4	7,5
3	12,5	3,13	46	7,6	8,4	15,5
4	12,5	6,25	50	33,2	1,36	gr 120
5	12,5	12,5	50	117,0	kl 0,4	gr 120

Als Ergebnis zeigt sich, dass der proteolytikumhaltige Ansatz (Fig. 2) gegenüber dem Leerwert (Fig. 1) eine Verringerung der Amplitude, der Fläche und der Lysiszeit (= $K_{Lys.tot.}$), dagegen eine Beschleunigung von V_a aufweist.
Bei Zusatz steigender Inhibitorenmengen zum Ansatz werden diese Veränderungen weitgehend wieder aufgehoben. In dem Beispiel (Abb. 1 und Tabelle 1) sind auch die Grenzen angedeutet, außerhalb derer die einzelnen TEG-Größen ihren Aussagewert verlieren. Veränderungen der max. Amplitude treten nur bei sehr starker Fibrinolyse im Ansatz a uf. Der Wert K (Lys. tot.) ist (s. Abb. 1 Fig. 4) nicht immer bestimmbar, da aus technischen Gründen die Registrationsdauer nicht beliebig ausgedehnt werden kann.

Bricht man aber zu einem bestimmten Zeitpunkt die Registrierung ab, so lassen sich durch die Abbruchzeiten nicht die Unterschiede der Fibrinolyse-intensität ausdrücken, die z. B. in Abb. 1 zwischen Fig. 4 und 5 bestehen.

Für die Erfassung der unvollständigen Fibrinolyse standen die von den beiden TEG-Schenkeln innerhalb bestimmter Zeitabschnitte umschlossene Fläche oder die Größe V_a zur Verfügung. Die Flächenbestimmung hat den Vorteil, dass sie über beliebige Grenzen innerhalb der Registrationsdauer ausgeführt werden kann. Es muß aber darauf hingewiesen werden, dass bei der vergleichenden Betrachtung der Flächen aus mehreren Ableitungen - (besonders, wenn Thrombelastogramme, die völlige Lysis zeigten, mit solchen, in denen sich die Gerinnsel nicht auflösten, verglichen wurden) - das Verhältnis der Flächen zueinander abhängig ist von dem gewählten Zeitraum, über den die Flächen bestimmt werden. Vermehrt sich im einem Falle die Fläche ständig, je größer dieser Zeitraum gewählt wird, so bleibt in TEG-Ableitungen mit Gerinnselauflösung der Flächenwert nach Erreichung eines Höchstwertes konstant. Somit ist die Zeitspanne, über die der Flächenvergleich ausgeführt wird, ausschlaggebend für das Verhältnis der Flächenwerte zueinander.

Auch V_a ist nur beschränkt zu Aussagen über Veränderungen der Fibrinolyse-intensität verwertbar. Nicht nur in Thrombelastogrammen ohne sichtbare Lysiszeichen nähern sich die Werte für V_a der Größe Null, sondern auch dann, wenn sich unter Proteolytikum-zusatz das Gerinnsel derartig schnell auflöst, dass sich nur eine ganz geringfügige TEG-Amplitude ausbilden kann. (Siehe Tab. 12) V_a ist demnach sowohl bei intensiver, als auch bei fehlender Fibrinolyse gering.

IV. Vergleichende Betrachtung der verwendeten Methoden, ihr Aussagewert und ihre Fehlerbreite.

Alle Methoden, das Thrombelastogramm ausgenommen, sind Endpunktbestimmungen, d. h. der Abschluss eines Vorganges (Gerinnung oder Fibrinolyse) wird erfasst.

Die Nachteile der Endpunktsbestimmung zeigten sich bei den Untersuchungen, einmal in der Schwierigkeit lange Lysiszeiten kontinuierlich zu überwachen und zweitens in der Unmöglichkeit den Grad der Gerinnselandauung bei Abbruch der Überwachung zu erfassen. Überwogen wurden diese Nachteile durch die Einfachheit von Anordnung und Durchführung, durch den geringen Aufwand und die große Zahl der nebeneinander ausführbaren Bestimmungen. Zur Durchführung einer Anzahl vergleichbarer Ansätze waren ausreichende Mengen qualitativ gleichen Citratplasmas nötig, das in Form von Mischplasma zur Verfügung stand. Durch Verwendung von Mischplasma waren außerdem die Versuchsbedingungen von Versuchstag zu Versuchstag ausgeglichener, als es bei Gebrauch von Einzelplasma der Fall gewesen wäre. Welche Unterschiede zwischen den verschiedenen Einzelplasmen hinsichtlich Koagulabilität und Fibrinolyseintensität (nach SK-Zusatz) bestehen, ist aus den folgenden Tabellen zu entnehmen. Hier sind 15 verschiedene Human-citratplasmen 1:5, jeweils in Doppelbestimmungen, sowohl im Recalcifizierungs-Fibrinolysetest als auch im PSVF verglichen, wobei die Ansätze in folgender Zusammensetzung ausgeführt wurden:

Recalcifizierungs-Visueller-Fibrinolysetest:

0,06 ccm $CaCl_2$-Lsg. 1,29 % + 0,05 ccm phys. Kochsalzlsg. + 0,05 ccm Streptokinaselsg 125 SK-Einh./ccm + 0,20 ccm Citratplasma 1:5

PSVF-Ansatz:

0,04 ccm $CaCl_2$ 1,29 % + 0,07 ccm phys. Kochsalzlsg.

+ 0,10 ccm Serum 1:1 (vom jeweiligen Plasma hergestellt) + 0,05 ccm Streptokinaselsg. 125 SK-Einh./ccm + 0,10 ccm Citratplasma.

Tabelle 2 zeigt qualitative Unterschiede von 15 gleichbehandelten Citratplasmen 1:5 hinsichtlich ihrer Gerinnungsfähigkeit (Nachgewiesen im Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest und im PSVF).

Plasma Nr	Recalcifizierungs-Ansatz		PSVF - Ansatz	
	mittl. Ger.Zeit sec.	proz.Abweich.v. d.durchschnittl. Ger.Zeit 363,1 sec = 100%	mittl. Ger.Zeit sec.	proz.Abweich.v. d.durchschnittl. Ger.Zeit 56,1 sec = 100%
1	520,6	+ 43,5 %	48,3	- 14,2 %
2	340,9	- 6,0 %	49,2	- 12,5 %
3	446,5	+ 23,1 %	56,8	+ 1,0 %
4	433,5	+ 19,5 %	52,0	- 7,5 %
5	404,8	+ 11,5 %	46,2	- 17,8 %
6	320,5	- 11,6 %	70,5	+ 25,5 %
7	275,9	- 24,0 %	72,5	+ 28,4 %
8	361,3	- 0,5 %	69,2	+ 23,0 %
9	186,7	- 48,5 %	38,5	- 31,5 %
10	287,6	- 20,8 %	57,6	+ 2,5 %
11	258,6	- 28,6 %	38,4	- 31,6 %
12	321,5	- 11,4 %	49,8	- 11,4 %
13	497,3	+ 37,0 %	60,7	+ 8,0 %
14	430,9	+ 18,8 %	57,2	+ 1,8 %
15	360,6	- 1,0 %	76,2	+ 35,5 %
Durchschnittswerte:				
	363,1 sec.	± 20,6 %	56,1 sec.	± 16,8 %

Tabelle 3 zeigt qualitative Unterschiede von 15 Citratplasmen 1 : 5 hinsichtlich Fibrinolyseintensität nach Streptokinasezusatz. (6,25 SK-Einh./Ans.)

Plasma Nr.	Recalcifizierungsansatz Lysiszeit in Min.	PSVF - Ansatz Lysiszeit in Min.
1	12,5 31,0	2,8 2,6
2	240 - 810 240 - 810	
3	53 gr 2100	3,8 4,0
4	7,8 27,5	gr 2100 gr 2100
5	54 gr 2100	2,4 2,3
6	2160 flockig 2160 flockig	80 - 660 1340 - 2100
7	1140 - 1740 1500 - 2220	80 - 660 80 - 660
8	210 - 720 210 - 720	80 - 660 80 - 660
9	4,2 4,3	2,6 3,0
10	120 - 680 120 - 680	36,0 35,5
11	10,0 11,0	4,0 4,0
12	57 105 - 675	3,4 3,6
13	37,5 43	5,2 6,0
14	2070 flockig 1350 - 2070	35 - 600 30 - 600
15	1350 flockig 1350 flockig	30 - 600 30 - 600

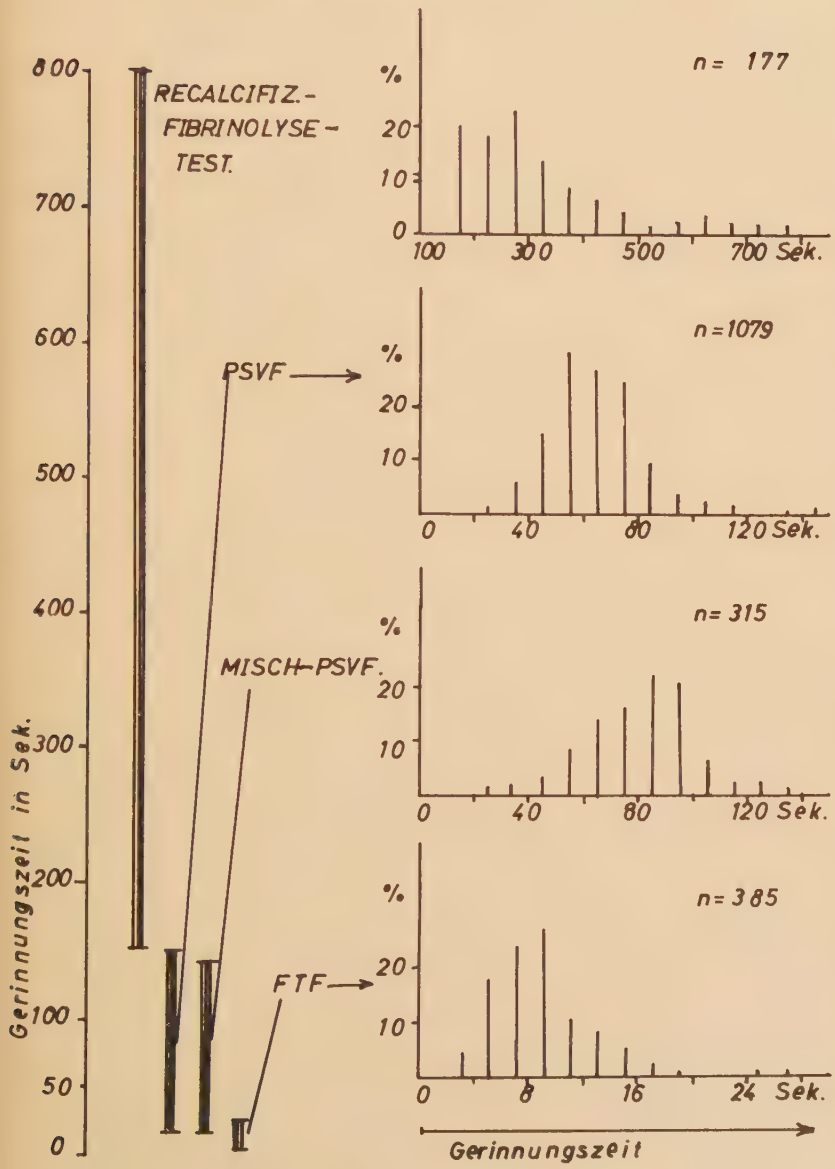
Die Durchschnittswerte für alle 15 Plasmen zeigen, dass die Gerinnungszeiten im Recalcifizierungsansatz etwa sechsmal höher als im PSVF sind. Die gemessenen Gerinnungszeiten weichen innerhalb der 15 Beispiele beträchtlich, bis max. 43,5 %, von einem gemeinsamen Mittelwert ab. Der Durchschnitt aller Einzelabweichungen liegt im Recalcificierungs-Visuellen-Fibrinolysetest mit ± 20,6 % etwas höher als im PSVF mit 16,8 %.

Die qualitativen Unterschiede der einzelnen Plasmen sind in Bezug auf die SK-induzierbare Fibrinolyse noch deutlicher (s. Tab. 3). Wegen der Ungenauigkeit der Bestimmung langer Lysiszeiten und den großen Differenzen zwischen Parallelbestimmungen, wurde auf eine prozentuale, vergleichende Betrachtung verzichtet. Die Lysiszeiten im PSVF liegen (s. Tab. 3) erheblich unter denen des Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetestes.
Bei der Erklärung dieser Lysisbeschleunigung im PSVF ist zu berücksichtigen, einmal die geringere Menge des aufzulösenden Fibrins im PSVF-Ansatz, zum anderen die durch den langsameren Gerinnungsablauf verursachte Beeinflussung der Lysisvorgänge im Recalcifizierten-Ansatz, weiterhin auch Veränderungen von Konzentration und Aktivierungszustand der Gerinnungs- und Lysisfaktoren im PSVF, wobei nach bisher unveröffentlichten Versuchen nach Marx dem Hagemanfaktor eine besondere Rolle zuzukommen scheint.

A) Größe und Streuung der Gerinnungszeiten in den einzelnen Methoden.

Die folgenden Aussagen sind an Mischplasmen gewonnen, wobei Blutproben von Dicumarol-behandelten Patienten (Prothrombin-index 80 - 100 %) neben solchen von blutnormalen Patienten gemischt verwendet wurden.

Abb. 3 Gerinnungszeiten und ihre Streuung in verschiedenen Methoden
(n = Zahl der Bestimmungen)



Stellt man alle während der Untersuchung in den verschiedenen Testen bestimmten Gerinnungszeiten zusammen, so differieren die Streubreiten der einzelnen Methoden erheblich. Unter Streubreite wird die Zeitspanne zwischen kürzester und längster gemessener Gerinnungszeit verstanden. Sie sind in Abbildung 3, linke Hälfte, dargestellt, während in den Diagrammen der rechten Abbildungshälfte die Verteilung der einzelnen Gerinnungszeitbestimmungen innerhalb dieser Streubreite aufgetragen sind. Die Verteilung wurde bestimmt, indem die jeweiligen Streubereiche in zeitliche Intervalle unterteilt und die Anzahl von Bestimmungen, deren Gerinnungszeiten innerhalb des gleichen Intervalles fielen, in Prozent zur Gesamtzahl der dabei ausgewerteten Gerinnungszeitbestimmungen ausgedrückt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4

Ansatz	Zahl d. Bestimmungen	Intervall in sec.	Streubereich
Recalcifizierungs-Vis.-Fibr.Test	177	50	150-800 sec
PSVF	1079	10	10-140 sec
Misch-PSVF	315	10	20-150 sec
FTF	385	2	4-28 sec

Unberücksichtigt blieben die Gerinnungszeiten, die durch Antikoagulantien oder durch Fibrinogenolyse verändert waren.

B) Zur Fehlergrenze der Methodik.

Um Veränderungen der Gerinnungs- und Lysiszeiten in ihrer Bedeutung beurteilen zu können, muß die Fehlerbreite bekannt sein. Diese wurde an Hand von Parallelansätzen bestimmt.

Aus den Einzelwerten (E_1, E_2 usw.) von Parallelbestimmungen wurde ein Mittelwert (M) errechnet und die Differenz zwischen M und jedem Einzelwert (E_1,E_2 usw.) in Prozenten (bezogen auf M = 100 %) als sog. "prozentuale Abweichung" (A) bestimmt.

$$A = \frac{E - M}{M} \times 100$$

Die so erhaltenen Prozentzahlen wurden, getrennt nach Testen, in zweifacher Weise ausgewertet:

1) Wurde aus mehreren Parallelbestimmungen ein Mittelwert ihrer "prozentualen Abweichungen" errechnet.

$$D = \frac{A_1 + A_2 \dots A_n}{n}$$

Dieser Durchschnittswert D wird im weiteren als "durchschnittliche prozentuale Abweichung"(D) benannt, und erlaubt einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit der Methode.

2) Wurde die Verteilung der einzelnen Parallelansätze innerhalb bestimmter Grenzen "prozentualer Abweichung"(A) bestimmt.

Nach der Größe der "prozentualen Abweichung "(A) wurden die Doppel- und Mehrfachbestimmungen in 4 Gruppen eingeordnet.

Gruppe 1	: "proæz. Abweichung"bis einschl.	± 10 %
Gruppe 2	: "proz. Abweichung"bis einschl.	± 15 %
Gruppe 3	: "proz. Abweichung"bis einschl.	± 20 %
Gruppe 4	: "proz. Abweichung"bis einschl.	± 31 %

Die Verteilung der ausgewerteten Parallelansätze innerhalb dieser Grenzen "prozentualer Abweichung" ist aus den Tabellen 5 und 6 ersichtlich.

Tabelle 5 zeigt für Gerinnungszeiten, wieviel Prozent der ausgewerteten Parallelbestimmungen innerhalb bestimmter Grenzen "prozentualer Abweichung" liegen.

Teste:	Zahl.der Parallel-ansätze	proz.Abw. bis ± 10 %	proz.Abw. bis ± 15 %	proz.Abw. bis ± 20 %	proz.Abw. bis ± 31 %
Recalc.-Vis.-Test	68	69,2 %	82,5 %	92,7 %	98,5 %
PSVF	167	87,4 %	95,8 %	97,6 %	100 %
PSVF+Thromb.	38	86,8 %	97,5 %	97,5 %	100 %
FTF	53	73,6 %	88,8 %	96,3 %	100 %
Euglobulinlysistest, wobei unterteilt ist nach Ausführung.					
a)recalc.	36	86,1 %	97,3 %	100 %	
b)m.Serum	31	87,1 %	97 %	97 %	100 %
c)m.Thromb.	31	87,1 %	97 %	97 %	100 %
Hasenversuche, nach Durchführung unterteilt.					
Misch-PSVF	122	90,2 %	94,2 %	97,5 %	100 %
Hasen-PSVF	19	73,7 %	94,8 %	94,8 %	100 %
Hasen-PSVF + Thromb.	30	60,0 %	83,5 %	86,7 %	93,4 %
Alle Teste zusammen	595	80,1 %	92,8 %	95,7 %	99,1 %

In Tabelle 6 ist das Gleiche an Hand der Lysiszeit - Parallelbestimmungen zusammengestellt. Hierbei wurden nur solche Bestimmungen verwendet, deren Lysiszeiten kürzer als 2 Stunden waren und die während dieser Zeitspanne unter ständiger Sichtkontrolle standen. In der Mehrzahl der Fälle lag die Lysiszeit zwischen 2 und 20 Minuten.

Tabelle 6 zeigt für Lysiszeiten, wieviel Prozent von Parallelansätzen innerhalb bestimmter Grenzen " prozentualer Abweichung " entfallen. (Nach Methoden getrennt.)

Teste :	Zahl d. Parallel-ansätze	proz.Abw. bis ± 10 %	proz.Abw. bis ± 15 %	proz.Abw. bis ± 20 %	proz.Abw. bis ± 30 %
Recalc. Vis.-Test	30	53,3 %	60,0 %	73,3 %	89,9 %
PSVF	146	76 %	93,1 %	96,5 %	99,3 %
PSVF+Thromb.	32	93,7 %	100 %		
FTF	43	85,1 %	91,9 %	94,2 %	100 %
Euglobulinlysistest, unterteilt nach Durchführung in					
a) ohne Thromb.	46	82,6 %	91,3 %	97,8 %	100 %
b) mit Thromb.	25	88 %	100 %		
Kaninchenversuche, unterteilt nach Durchführung in					
Misch-PSVF	110	80,6 %	89,7 %	95,4 %	100 %
Misch-PSVF + Thromb.	24	83,3 %	96,3 %	96,3 %	100 %
Alle Teste zusammen					
a) ohne Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest	426	84,2 %	94,6 %	96,0 %	99,9 %
b) einschließlich Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest	456	80,4 %	90,3 %	92,3 %	98,2 %

In der folgenden Tabelle sind die " durchschnittlichen prozentualen Abweichungen (D)" für die einzelnen Methoden angegeben. Durch"D" wird ausgedrückt, um wieviel Prozent von dem Mittelwert einer Doppel-oder Mehrfachbestimmung die Einzelwerte durchschnittlich abweichen. Hierdurch ist eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Methode gemacht.

Tabelle 7 zeigt für die einzelnen Methoden eine Zusammenstellung der " durchschnittlichen prozentualen Abweichungen (D)" für Gerinnungs-und Lysiszeitbestimmungen.

Teste :	Gerinnungszeitbestimmung		Lysiszeitbestimmungen	
	Zahl d.Parallel-Ans.	"durchschn. proz.Abw. "	Zahl d.Parallel-Ans.	"durchschn. proz. Abw."
Recalc. Vis.Test	68	7,7 %	30	15,7 %
PSVF	167	4,5 %	146	6,6 %
PSVF+Thromb.	38	4,9 %	32	3,4 %
FTF	53	6,2 %	43	5,8 %
Euglobulinlysistest,unterteilt nach Durchführung				
a)recalc.	36	5,4 %	46	6,1 %
b)m.Serum	31	4,6 %		
c)m.Thromb.	31	5,5 %	25	3,9 %
Hasenversuche,unterteilt nach Durchführung				
Misch-PSVF	122	4,9 %	110	6,1 %
Hasen-PSVF	19	7,0 %		
Hasen-PSVF m.Thromb.	30	5,5 %	24	5,6 %
Durchschnitt für alle Methoden	595	5,6 %	456	6,5 %

Aus den Tabellen 5,6,7 geht hervor :

1) Trotz der unterschiedlichen Anzahl der jeweils ausgewerteten Parallelbestimmungen verhalten sich die einzelnen Methoden hinsichtlich ihrer"prozentualen Abweichung (A) " für Gerinnungs-und Lysiszeitbestimmungen annähernd gleich.
2) Vergleicht man,ohne die geringen Unterschiede für die einzelnen Teste zu berücksichtigen, 595 Gerinnungs- und 456 Lysiszeitparallelbestimmungen,so liegen 92,8 % der Gerinnungs- und 90,3 der Lysiszeitbestimmungen innerhalb einer Abweichungsgrenze von $\pm$ 15 Prozent.

3) Auch die "durchschnittliche prozentuale Abweichung" (D) (s. Tab. 7) für die einzelnen Ansatzarten, liegt sowohl für die Gerinnungs- als auch Lysiszeitbestimmungen mit 4 bis 8 % bzw. 3 bis 7 % (15 % Recalc. Vis. Test) in fast gleichen Grenzen.
4) Die "durchschnittliche prozentuale Abweichung" von 595 Gerinnungs- und 456 Lysiszeitbestimmungen liegt, ohne Berücksichtigung des Ansatzmodus, für die Gerinnungszeiten mit 5,6 % gegenüber 6,5 % bei den Lysiszeiten etwas niedriger.

Übernimmt man diese Ergebnisse, gewonnen an Parallelbestimmungen, zur Beurteilung von Einzelbestimmungen untereinander- (vorausgesetzt, dass diese untereinander vergleichbar sind) - so kann man Unterschiede zwischen zwei Einzelwerten mit 90 prozentiger Sicherheit nur dann als signifikant ansehen, wenn man eine Fehlergrenze von $\pm$ 15 % einkalkuliert, d. h. wenn sich die Streubezirke von $\pm$ 15 % um die jeweiligen Einzelbestimmungen nicht berühren. Dieses gilt sowohl für die Beurteilung von Gerinnungs- als auch Lysiszeiten.

Vergleicht man abschließend an obigen Ergebnissen den Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest mit dem Plasma-Serum-Visuellen-Fibrinolysetest (PSVF), so ergibt sich:

1) Beide Methoden sind qualitativen Unterschieden der verwendeten Plasmen in hohem Maße unterworfen.
2) Die Streubreite für die Gerinnungszeiten ist im PSVF mit 110 sec gegenüber dem Recalcifizierungs-Vis. Test mit 650 sec etwa sechsmal geringer (Abb. 3).
3) Die Gerinnungszeiten im Recalcifizierungs-Vis.-Test sind etwa 5 - 6 mal länger als im PSVF (Tab. 2).
4) Die Lysiszeiten sind bei gleichen Proteolytikums-Ansatzkonzentrationen im Recalcifizierungs-Vis.-Test erheblich länger. (Tab. 3).
5) Die "durchschnittliche proz. Abweichung" sowohl für Gerinnungs- als auch für Lysiszeitbestimmungen

ist im Recalcifizierungs-Vis.-Test höher (Tab. 7).

6) Bei den Gerinnungszeiten liegen 82,5 % im Recalcifizierungs-Vis.-Ansatz gegenüber 95,8 % (Tab. 5) im PSVF; bei den Lysiszeiten 60,0 % im Recalc. gegenüber 93,1 % im PSVF (Tab. 6) aller Parallelbestimmungen innerhalb eines Bereiches "prozentualer Abweichung" von ± 15 Prozent.
7) Als weiterer Vorteil des PSVF wird die stärkere Retraktion angesehen, die, durch scharfe Abgrenzung von Gerinnsel und Lysisflüssigkeit, die optische Überwachung erleichtert.

Die Beschleunigung der Gerinnungs- und Lysisvorgänge, die größere Genauigkeit, und die schnelle Retraktion lassen den Plasma-Serum-Visuellen-Fibrinolysetest (PSVF) als eine Verbesserung gegenüber dem Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest erscheinen.

Untersuchungen in vitro

I. Gerinnungszeiten und ihre Veränderung im Verlauf der Untersuchungen.

Die Kenntnis gerinnungsverändernder Eigenschaften von Substanzen ist für deren Verwertbarkeit im Tierversuch und bei der Beurteilung von Lysiszeitveränderungen von Wichtigkeit. Wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird, muß z. B. bei einer Verlängerung der Gerinnungszeiten mit Lysiszeitveränderungen gerechnet werden (Fibrinogenolyse, Manifestation von Progressiv-Antiplasmin).

Nachdem in Abbildung 3 die absoluten Werte der Gerinnungszeiten und ihre Streubreiten für die einzelnen Teste aufgezeigt wurden, soll im folgenden auf den Einfluss einzelner Substanzen und Faktoren auf die Gerinnungsabläufe eingegangen werden. Unberücksichtigt bleiben diejenigen Faktoren (Substanzen oder mech. Größen) deren Einfluss auf die vorliegenden Untersuchungsergebnisse durch konstante Versuchsanordnung ausgeschaltet werden konnten (z. B. Thrombin, Calciumchlorid, Temperatur usw.).
Nach dieser Einschränkung sind zu überprüfen
a) als Substanzen mit Einfluss auf die Gerinnungsabläufe:
   die verwendeten Antikoagulantien
   Protaminsulfat.
b) als Substanzen und Faktoren ohne signifikanten Einfluss auf die Gerinnungsabläufe :
   Dauer der Versuchsdurchführung
   die verwendeten Proteolytika
   die verwendeten Fibrinolyseinhibitoren.
Die Gerinnungszeitveränderungen der unter a) geführten Substanzen sollen in den entsprechenden Kapiteln in Zusammenhang mit dem Lysiszeitverhalten betrachtet werden.

A) Einfluss der Dauer der Versuchsdurchführung auf die Gerinnungszeit.

Ein Ansteigen der Gerinnungszeiten bei zunehmender Dauer der Versuchsdurchführung konnte signifikant nur in einigen Versuchen festgestellt werden. Bei den meisten Versuchsreihen dagegen lagen die Unterschiede zwischen den zuerst und zuletzt bestimmten Gerinnungszeiten innerhalb der Fehlergrenze.

B) Einfluss der Proteolytika auf die Gerinnungszeit.

Eine Veränderung der Gerinnungsabläufe nach Proteolytikumszusatz wäre auf zweierlei Art denkbar: einmal durch eine Sofortwirkung, ähnlich der von Thrombin oder Heparin, zum anderen durch eine sekundäre Wirkung, nämlich durch proteolytischen Abbau einzelner Gerinnungsfaktoren.

Für die erste Möglichkeit konnten keine Hinweise gefunden werden, die reproduzierbar und abhängig von der verwendeten Proteolytikum-menge waren. Dieses ist aus Tabelle 8 zu entnehmen, die das Verhalten der Gerinnungszeiten im PSVF bei steigenden Streptokinase-konzentrationen im Ansatz zeigt.

Tabelle 8

SK-E / Ans.	0,0	0,8	3,1	12,5	50,0	100	200
Ger.-Zeit sec.	53,2	55,4	46,5	54,0	54,7	59,1	56,0

Die sekundäre Beeinflussung der Gerinnungsvorgänge nach Proteolytikum-zusatz konnte, besonders bei höheren Streptokinase oder Plasmin Mengen, im FTF und im Euglobulinlysistest konstant beobachtet werden, und wurde in diesen Testen zur Bestimmung der Fibrinogenolyse herangezogen.

C) Einfluss der Inhibitoren auf die Gerinnungszeit.

Weder die Organinhibitoren (Bayer A 128, Lungeninhibitor oder Trasylol (Bayer) noch Epsilon-Amino-n-Capronsäure zeigten im PSVF, im FTF und im TEG reproduzierbare, signifikante Gerinnungszeitveränderungen. Zur Verdeutlichung dieser Aussage werden in Tabelle 9 aus drei Bestimmungsreihen mit 12 Ansätzen (ohne Inhibitor, mit ACS und mit Trasylol) jeweils 6 aufeinanderfolgende Recalcifizierungszeiten angeführt.

Ansatz: 0,20 ccm Plasma, 0,06 ccm $CaCl_2$ 1,29 %, 0,05 ccm phys. Kochsalzlsg., 0,05 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Inhibitor gelöst in phys. Kochsalzlsg. Es wurde der Recalcifizierungs-Visuelle-Fibrinolysetest gewählt, da er gegenüber den schneller-gerinnenden Ansätzen am empfindlichsten auf gerinnungsverändernde Einflüsse anspricht.

Tabelle 9 zeigt den Einfluss von Inhibitoren auf die Recalcifizierungszeiten.

Beisp. Nr.	Recalcifizierungszeiten in sec. aus Ansätzen		
	ohne Inhibitor	mit ACS 100 γ/Ans.	mit Organinh.(Trasylol) 12,5 K.I.Einh./Ans.
1	187,7	172,0	217,4
2	188,2	177,6	199,2
3	210,0	158,9	205,3
4	204,4	186,4	198,5
5	183,3	206,4	239,3
6	185,2	175,7	207,3
Durchschnittswerte	193,1 sec	179,5 sec	211,1 sec

Legt man der Beurteilung dieses Beispieles die oben bestimmte Fehlergrenze zu Grunde, so kann eine signifikannte Gerinnungszeitbeeinflussung durch Inhibitoren-

zusatz nicht festgestellt, wohl aber durch die errechneten Durchschnittszahlen die Tendenz zur Verkürzung nach ACS und zur Verlängerung nach Organinhibitor beobachtet werden.

Nachdem auch bei gleichzeitiger Zugabe von Inhibitoren und Proteolytikum zum Ansatz keine Änderungen der Gerinnungszeiten beobachtet wurden, wird im folgenden allgemein auf die Wiedergabe der Gerinnungszeiten verzichtet.

II. Fibrinolyse, Aktivierung und Hemmung.

Alle verwendeten Methoden haben den Nachteil, das Thrombelastogramm ausgenommen, Endpunktsbestimmungen zu sein. Allein die Zeitspanne bis zur völligen Auflösung des Gerinnsels wird zu Aussagen über die Lysisintensität herangezogen, wobei kurze Lysiszeiten einer starken und lange Lysiszeiten einer geringen Fibrinolyse zugeordnet werden. Es wird demnach jede Verlängerung der Lysiszeiten als Fibrinolysehemmung gewertet.

Die Fibrinolyse wird beeinflusst:

A) durch physikalische und apparative Faktoren
B) durch fibrinolyse - beschleunigende oder - hemmende Substanzen.

Zu A gehören neben Temperatur und Gefäßbeschaffenheit (Form, chemische Zusammensetzung (s. Lit. 19)) weiterhin:

1) Alle Vorgänge, die zu einer ungleichmäßigen Gerinnseldichte führen, z. B. Erschütterungen oder ungleichmäßige Durchmischung des Ansatzes. Diese dichteren Gerinnselbezirke lösen sich langsamer auf.
2) Die Zeitspanne vor Gerinnungseintritt, während der die einzelnen Ansatzkomponenten aufeinander einwirken. Bei hohen Ansatzkonzentrationen von Proteolytikum kommt es

in einigen Testen (FTE, Euglobulinlysistest), neben der erwähnten Gerinnungszeitverlängerung, zu einer Verkürzung der Lysiszeiten. (Fibrinogenolyse). In proteolytikumarmen Ansätzen dagegen wird häufig eine Lysiszeitverlängerung beobachtet (s. Tab. 10).

Tabelle 10 zeigt Lysiszeitverlängerung bei steigender Inkubationsdauer des Ansatzes vor Eintritt der Gerinnung (Test PSVF bei 37° C inkubiert).

Ausführung: Reagenzglas Nr. 1:

1,0 ccm Serum 1:1
0,20 ccm phys. Kochsalzlsg.
0,40 ccm $CaCl_2$ 1,29 %

Reagenzglas Nr. 2:

0,50 ccm ACS-Lösung (ergibt im vollständigen Ansatz 5 γ /Ans.)
0,50 ccm SK-Lösung (ergibt im fertigen Ansatz 20 SK-Einh./Ans.)

1,00 ccm Plasma

In einem Uhlenhuthröhrchen wurden 0,16 ccm der Mischung aus Reagenzglas 1 und 0,20 ccm der Mischung aus Reagenzglas 2 nach steigender Inkubationsdauer zusammengegeben.

Tabelle 10

Ans. Nr.	Inkubationszeit Min.	Gerinnungszeit sec.	Lysiszeit Min.
1	0,5	51,3	6,8
2	1,5	56,6	7,2
3	3	53,5	8,0
4	6	56,0	8,4
5	10	56,9	9,5
6	15	57,0	13,0
7	18	52,8	11,7
8	21	50,0	12,1
9	25	50,2	12,1

Aus der Tabelle ergibt sich bei konstanzen Gerinnungszeiten ein deutliches Ansteigen der Lysiszeiten, vermutlich Ausdruck steigender Antiplasmin-wirkung (s. Lit. 4).

Zu Gruppe B, den fibrinolyse-verändernden Substanzen, gehören:

1) Proteolytika
2) Fibrinolyse-Inhibitoren
3) Verschiedene Substanzen, wobei zwischen ansatznotwendigen, Calcium-Ionen (Lit. 18) und Thrombin, und nicht ansatznotwendigen, Protaminsulfat und Heparin (oid) -präparaten, zu unterscheiden ist. Letztere werden in besonderen Abschnitten behandelt.

1) Einfluss der Proteolytika (Streptokinase und Plasmin) auf die Fibrinolyse.
In Abbildung 4 sind die Veränderungen der Lysiszeiten unter steigenden Proteolytikum-zusätzen, getrennt für die einzelnen Teste, dargestellt. Man erkennt die Abhängigkeit der Lysiszeiten von der verwendeten Proteolytikumkonzentration. Im PSVF zeigt die Verlaufskurve ein Lysisoptimum bei Konzentrationen zwischen 25 - 100 SK-Einh./ Ansatz. Im FTF und Euglobulinlysistest konnte, infolge Fibrinogenolyse nach hohen Streptokinase- oder Plasminmengen (nicht eingezeichnet), ein Gerinnsel nicht mehr festgestellt werden.

Abbildung 4 zeigt weiterhin, dass in den einzelnen Testen jeweils unterschiedliche Proteolytikummengen notwendig sind, um Lysiszeiten von beispielsweise 1 - 3 Minuten zu erreichen. Hierbei erwies sich der PSVF nach dem Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest (s. Tab. 3) am unempfindlichsten.

Es sei betont, dass Abbildung 4 lediglich das prinzipielle Verhalten der Lysiszeiten nach Proteolytikum-zusatz an-

Abb.4

Lysiszeitverhalten unter steigenden Proteolytikumzusatz in den verwendeten Testen und Mengen

Fig. I Streptokinase

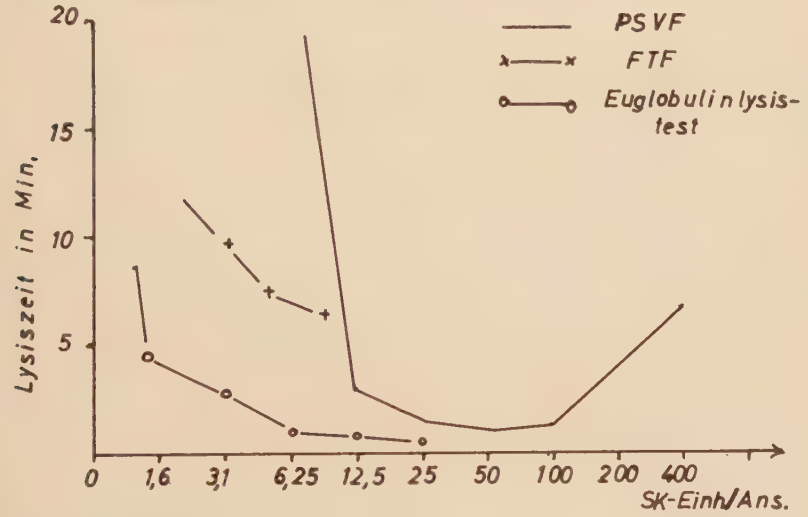
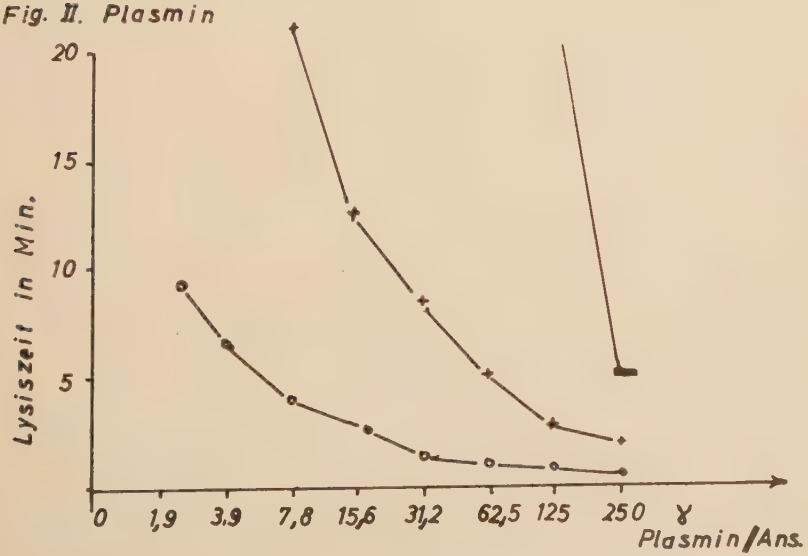


Fig. II. Plasmin



deuten kann. Wie Tabelle 11 zeigt, bestehen zwischen Versuchsreihen gleicher Anordnung erhebliche Unterschiede. Diese werden besonders im Bereich längerer Lysiszeiten deutlich. Betrachtet man z. B. in Tabelle 11 alle Ansätze, die mit 12,5 SK-Einh./Ans. ausgeführt wurden, so schwanken hier die Lysiszeiten zwischen 2,9 - 56 Minuten. Außer den absoluten Lysiszeiten vergleichbarer Ansätze differieren die Kurvenverläufe der einzelnen Versuchsreihen, wenn man diese in Diagrammen (Abszisse = SK-Konzentration; Ordinate = Lysiszeit) graphisch darstellt.

Tabelle 11 zeigt das unterschiedliche Ausmaß von Lysiszeitveränderungen in 8 Versuchsreihen bei steigenden Streptokinase-ansatzkonzentrationen, ausgeführt im PSVF. (Die Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Minuten.)

Vers. Nr.	SK - Einheiten (Bistreptase) im PSVF - Ansatz							
	400	200	100	50	25	12,5	6,3	0
1	6,9	1,4	1,2	1,0	1,4	2,9	gr 30	gr 36 h
2		1,4	1,3	3,6	8,1	9,6	gr 50	gr 36 h
3		1,2	2,1	4,4	7,6	22,	gr 180	gr 36 h
4		0,9	1,8	1,9	3,5	4,8		gr 36 h
5		1,1	1,1	1,4	2,8	7,4		gr 36 h
6			0,9	1,2	2,0	3,6		gr 36 h
7		1,5		1,5	4,0	56,0		gr 36 h
8		2,0	1,0	1,7	2,6	6,1	gr 150	gr 36 h

Der Einfluss steigender Proteolytikums-konzentrationen auf das Thrombelastogramm sei an Hand der folgenden Abbildungen und Tabellen aufgezeigt. Die Veränderungen nach Zusatz unterschiedlicher Streptokinasemengen zum TEG-P_{16} SF - Ansatz sind aus Abb. 5 und Tab. 12, zum Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel aus Abb. 6 und Tab. 13 ersichtlich. Die TEG-Veränderungen nach Plasminzusatz zum Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel sind Abb. 10 und Tab. 14 zu entnehmen.

Tabelle 12 zeigt die Veränderung der einzelnen TEG-Messgrößen unter steigenden SK-Ansatzkonzentrationen im TEG-P_{16}SF (vgl. Abb. 5).

Fig.Nr. Abb.5	SK-Einh. im Ansatz	$K_{(Lys.tot.)}$ Min.	Fläche (in 30 Min) cm^2	V_a mm/Min	max.a. mm
1	200	9	0,4	1,44	4
2	100	1,8	- 0,1	1,28	1,5
3	50	1,8	- 0,1	3,52	2
4	25	2,0	0,7	3,80	3
5	12,5	4,0	1,2	11,36	13
6	6,25	9,5	5,9	4,68	16
7	3,13	gr 30	18,2	2,48	19
8	-	gr 30		0,4	37

Tabelle 13 zeigt am Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel die Veränderungen der einzelnen TEG-Messgrößen in Abb. 6 unter abnehmenden Streptokinase-ansatzkonzentrationen.

Fig.Nr. Abb.6	SK-Einh. im Ansatz	$K_{(Lys.tot.)}$ Min.	Fläche (in 27 Min) cm^2	V_a mm/Min	max.a. mm
1	200	5,3	2,0	21,2	36
2	25	6,0	2,5	20,0	39
3	12,5	7,5	3,6	20,8	42
4	6,25	8,5	4,3	15,68	41
5	3,13	12,5	6,7	9,92	42
6	1,56	18,5	9,4	6,48	42
7	-	gr 27,5	21,9	0,5	43

Abb. 5 u. 6 zeigt in TEG-Pausen den Einfluss abnehmender SK-Konzentrationen in folgenden Ansätzen:

Abb. 5 im TEG-P_{16}SF

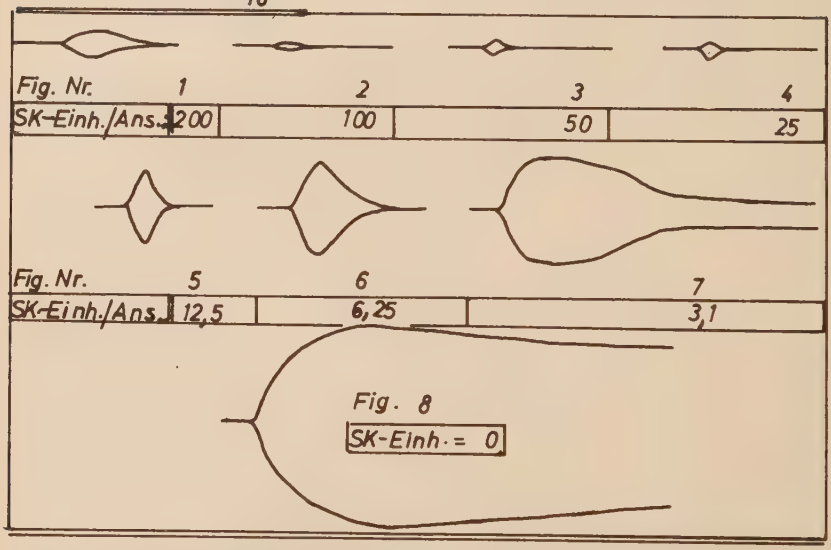


Abb. 6 im TEG-Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel

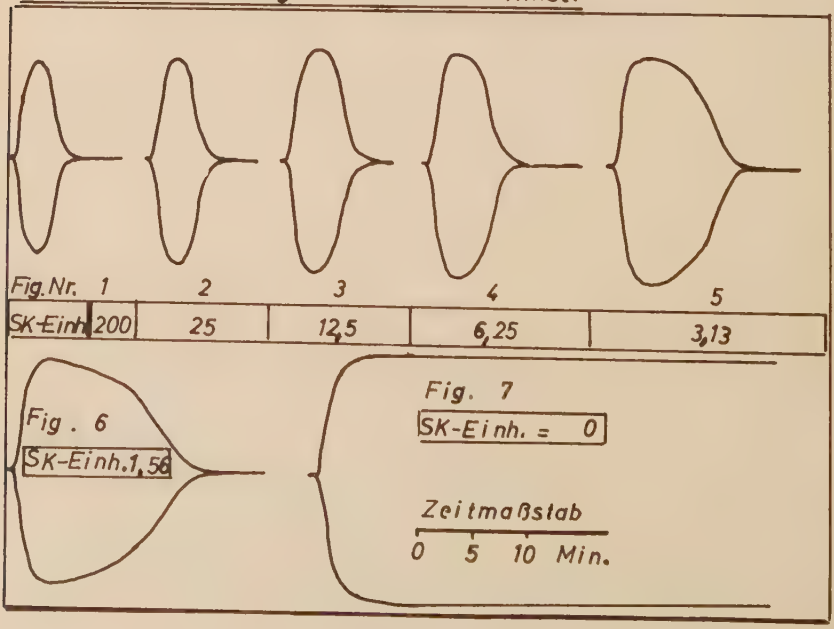


Tabelle 14 zeigt für die Figuren 1 - 5 in Abbildung 10 die Veränderungen der TEG-Größen bei wechselnden Plasminzusatz zum Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel.

Fig.Nr. Abb.10	Plasmin-Konz.γ/Ans.	$K_{(Lys.tot)}$ Min	Fläche (in 27 Min) cm^2	V_a mm/Min	max.a. mm
1	250	5,8	1,7	17,6	29
2	125	10	4,6	13,28	39
3	62,5	15,5	8,0	9,68	43
4	31,25	23	14,0	6,76	46
5	-	gr 30	29,1	kl 0,5	50

Zusammenfassend ergibt sich, dass in den verwendeten Testen unter Plasmin- oder Streptokinasezusatz Lysiszeiten zwischen 2 - 5 Minuten erreicht werden können, wofür aber jeweils unterschiedliche Proteolytikumkonzentrationen notwendig sind. FTF und Euglobulinlysistest erwiesen sich gegenüber Proteolytika empfindlicher als die plasmahaltigen Ansätze (PSVF und Recalcifizierungs-Visueller-Fibrinolysetest). Für das Thrombelastogramm gilt prinzipiell das gleiche. Grundsätzliche Unterschiede der Ergebnisse optischer Fibrinolyseregistration in vitro und dem Verhalten der TEG-Größe ($K_{(Lys.tot.)}$ waren nicht feststellbar.
So zeigte sich beispielsweise sowohl im PSVF als auch im TEG-P_{16}SF für Streptokinase ein Wirkungsoptimum zwischen 25 - 100 SK-Einh./Ans. (s. Abb. 5 und Tab. 12).
Auf den Einfluss, den die Lysisintensität auf die Empfindlichkeit der Fibrinolyse-teste zeigt, soll weiter unten (Tab. 21 und Abb. 10) eingegangen werden.

2) Einfluss der Inhibitoren auf die Fibrinolyse.

a) Nachweis der Inhibitorenwirksamkeit von Epsilon-Amino-n-Capronsäure (ACS) und Organinhibitoren (Trasylol, Lungeninhibitor).

Zunächst soll an Hand jeweils dreier Versuchsreihen in den verschiedenen Testen das typische Lysiszeitverhalten unter steigenden Inhibitoren-ansatzkonzentrationen aufgezeigt werden.

Tabelle 15 zeigt den Einfluss steigender ACS-Konzentrationen auf die Lysiszeiten im PSVF, Rinder-FTF und im Euglobulinlysistest. (Die Zahlen, jeweils der Mittelwert aus zwei Parallelbestimmungen, bedeuten Lysiszeiten in Minuten.)

ACS-Konz, γ/Ans.	Ansatz : PSVF 1	2	3	Ansatz : Rinder-FTF 1	2	3
0	1,8	1,2	2,5	9,8	7,8	6,5
2,5	2,2		3,3	18,3	10,6	9,8
5	2,7	2,8	3,4	15,4	12,5	
10	3,4	2,9	4,3	16,4	12,8	9,9
15	9,9	4,7	4,8			
20	gr 36 h	gr 36 h	gr 36 h			
25				17,7	13,4	11,2
50					15,1	10,3
100				24,1	15,6	11,3
SK-Einh. /Ans.	200	100	50	3,2	4,8	8,0

ACS-Konz. γ/Ans.	Ansatz : Euglobulinlysistest (ohne Thrombin) 1	2	3	4
0	1,3	1,1	1,3	1,1
5,0	1,1	1,4	2,9	2,5
12,5	1,1	1,6	4,1	3,0
25	1,6	2,0	6,1	4,3
50	2,8	4,2	19,0	8,6
100	5,1	7,9	gr 36 h	gr 36 h
SK-Einh./Ans.	6,25	6,25	6,25	6,25
Serum/Ans.	-	-	0,1 ccm	0,1 ccm

Tabelle 16 zeigt den Einfluss steigender Organinhibitoren-konzentrationen auf die Lysiszeiten im PSVF, Rinder FTF und Euglobulinlysistest. (Die Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Minuten von Einzelbestimmungen.)

K.I.Einh. /Ans.	Ansatz : PSVF 1	2	3	4
0	0,9	1,6	1,4	1,0
0,39	1,0			
0,78	1,3		2,0	
1,56	1,4	2,0	2,6	1,8
3,12	2,0	1,8	2,3	2,0
6,25	3,5	4,2	8,4	3,2
12,5	26-38 h	24-36 h	gr 36 h	30 h fl
25,0	gr 38 h	gr 50 h		
SK-Einh. /Ans.	200	100	50	25

K.I.Einh. / Ans.	Ansatz: Rinder-FTF mit 4,37 SK-Einh./Ans. 1	2	3
0,0	4,6	4,6	6,0
0,39	5,2	5,3	
0,78	4,9	5,0	22,7
1,56	6,2	7,5	
3,12	8,0	10,2	
6,25	4-14 h	4-14 h	gr 16 h
12,5	gr 36 h	gr 36 h	

K.I.Einh. / Ans.	Ansatz: Euglobulinlysistest (ohne Thrombin) mit 6,25 SK-Einh./Ans. 1	2	3	4
0,0	0,9	1,3	1,5	2,0
1,56	2,4	2,7	2,4	1,7
3,13	4,4	3,6	3,6	3,0
6,25	5,8	6,9	4,4	3,8
12,5	15 h fl	15 h fl	22-27 h	15 h fl
25,0	gr 40 h	gr 40 h	gr 40 h	gr 4o h
Serum im Ans.	-	-	0,10 ccm	0,10 ccm

Die Wirksamkeit von ACS und den Organinhibitoren als Antifibrinolytika wird durch die Tabellen 15 und 16 bestätigt.

Als wichtigstes Ergebnis aber ist die unterschiedliche Wirksamkeit von ACS in den einzelnen Testen zu werten. So reichen im PSVF 20 γ ACS/Ans. aus, um die Lysiszeiten von 1,8 bis 2,5 Min. in den inhibitorenfreien Ansätzen auf über 36 h ansteigen zu lassen. Im Euglobulinlysistest und im FTF vermag dagegen die 5-fache ACS-Menge (= 100 γ /Ans.)die Fibrinolyse nur geringfügig zu hemmen. So verlängern sich im FTF die Lysiszeiten von 6,5 bzw. 9,8 auf 11 bzw. 24 Minuten, im Euglobulinlysistest von 1,3 auf 5,1 bzw. 7,9 Minuten.

Lediglich nach Serumzusatz zum Euglobulinlysistest verbesserte sich die ACS-Wirkung. Die Organinhibitoren zeigen dagegen in ihrer Wirksamkeit keine derartige Testabhängigkeit. Der Inhibitoreneffekt von 12,5 K.I. Einh./Ans. ist in allen 3 Testen etwa gleich.

Das Ergebnis der Tabellen 15 und 16 wird in Abbildung 7 verdeutlicht und in den folgenden Tabellen 17, 18, 19 bestätigt. Die thrombelastographische Bestätigung erfolgt in den Abbildungen 8 und 9.

In Abb. 7 sind 4 Diagramme gezeichnet, auf deren Ordinaten der dekadische Logarithmus der Lysiszeiten (in Minuten) und auf deren Abszissen steigende Inhibitorenkonzentrationen aufgetragen sind. Nach Inhibitoren getrennt (ACS links, Organinhibitoren rechts), sind die Lysiszeitveränderungen im PSVF und im FTF in den oberen bzw. unteren 2 Diagrammen eingezeichnet. Die Lysiszeiten für die 3 Inhibitoren wurden in den beiden Testen jeweils am gleichen Ausgangsmaterial (Plasma, Fibrinogen) bestimmt. Man erkennt, dass die Kurvenverläufe in beiden Testen bei Verwendung von ACS erheblich, nicht dagegen bei Zusatz von Organinhibitoren differieren.

Die Bestätigung der Aussage, dass die fibrinolysehemmende Wirksamkeit von ACS in den einzelnen Testen (im Gegensatz zu den Organinhibitoren) unterschiedlich ist, erfolgt in den Tabellen 17, 18, 19. Nach Methoden getrennt, sind aus einer Reihe von Versuchen die Lysiszeiten mit und ohne Zusatz bestimmter Inhibitormengen aufgeführt. Die jeweils verwendeten Proteolytikumskonzentrationen sind nicht berücksichtigt. Ebenso wurde nicht zwischen den Organinhibitoren (Trasylol, Lungeninhibitor) unterschieden, da diese wirkungsmäßig keine wesentlichen Unterschiede zeigen (s. Abb. 7)

Abb.7 Typisches Verhalten der Lysiszeit bei verschiedenen Konzentrationen von ACS und Organinhibitoren im PSVF und FTF.

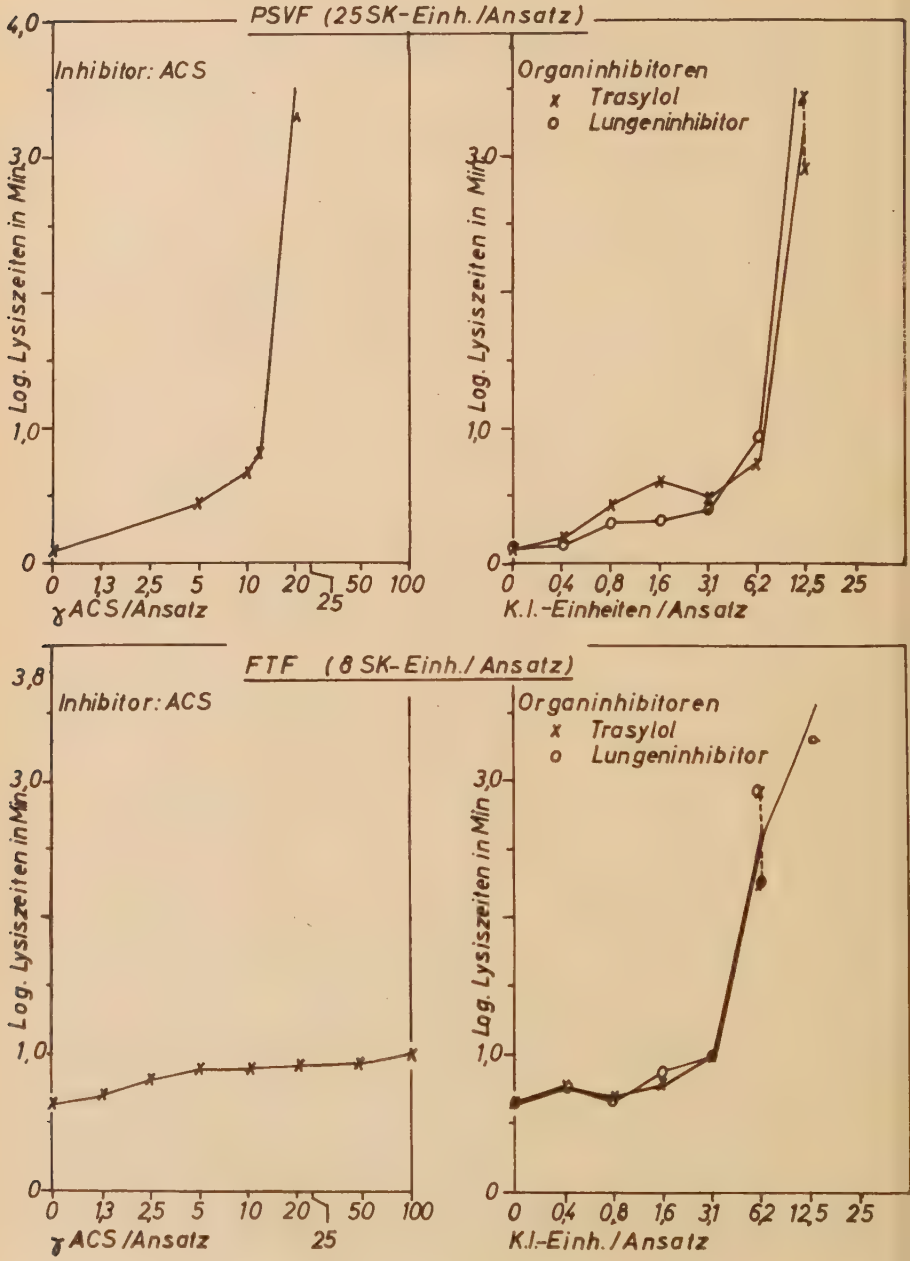


Tabelle 17 zeigt für den PSVF in je 20 Versuchen die Wirkung von ACS und Organinhibitoren (Trasylol und Lungeninhibitor) auf die Lysiszeiten.
(Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Minuten).

Test:	PSVF mit ACS			PSVF mit Organinhibitor		
Vers.	ACS-Konzentration γ/Ans.			K.I. Einh./Ansatz		
Nr.	0	15	25	0	12,5	25
1	2,0		gr 36 h	0,9	24 - 36 h	gr 36 h
2	1,6		gr 36 h	1,8	24 - 36 h	gr 36 h
3	1,0		gr 36 h	1,9	gr 36 h	
4	2,1		gr 36 h	3,5	gr 36 h	
5	2,0	gr 36 h		4,8	gr 36 h	
6	1,2	gr 36 h		1,5	24 - 36 h	gr 36 h
7	1,6	gr 36 h		1,6		gr 36 h
8	1,7	gr 36 h		1,1		gr 36 h
9	1,6	11,5	gr 36 h	1,4	gr 36 h	
10	1,9	8,3	gr 36 h	2,8	gr 36 h	
11	1,4	gr 36 h		7,4	gr 36 h	
12	1,1	gr 36 h		3,3		gr 36 h
13	1,5	gr 36 h		4,5	gr 36 h	
14	1,5	gr 36 h		1,2	7 - 18 h	
15	1,5	gr 36 h		1,0	6 - 17 h	
16	1,4	gr 7,1	gr 36 h	1,4	16 - 34 h	
17	1,4	5,3	gr 36 h	2,9	gr 36 h	
18	2,2		gr 36 h	1,2	18 - 36 h	
19	2,8		gr 36 h	1,0	6 - 16 h	
20	4,5	5,0	gr 36 h	1,4	gr 36 h	

Tabelle 18 zeigt die Wirksamkeit von 100 γ ACS oder vergleichsweise 12,5 K.I.Einheiten Organinhibitor im FTF-Ansatz.
(Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Min.)

Versuch Nr.	ACS-Konzentration γ/Ans.		Organinhibitor K.I.Einh. im Ansatz	
	0	100	0	12,5
1	4,9	10,3	1,9	gr 34 h
2	6,0	14,3	3,1	gr 34 h
3	6,2	8,8	3,2	gr 34 h
4	7,6	15,2	4,0	gr 34 h
5	7,7	57,	4,6	gr 34 h
6	7,8	35,	5,1	gr 34 h
7	7,9	15,9	6,0	120
8	8,2	13,0	6,0	16 h
9	8,9	14,4	6,4	gr 34 h
10	9,0	20,6	6,5	gr 34 h
11	9,1	13,0	6,8	gr 34 h
12	10,4	28,	8,5	gr 34 h
13	10,5	27,8	8,7	gr 34 h
14	13,2	44,	9,5	gr 34 h
15	13,6	28,4	12,6	gr 34 h

Tabelle 19 zeigt die Wirksamkeit von 100 γ ACS und vergleichsweise von 12,5 K.I.Einheiten Organinhibitor im thrombin- und serum-freien Euglobulinlysistest.
(Die Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Minuten.)

Versuch Nr.	ACS-Konzentration γ/Ans.		Organinhibitor K.I.Einh. im Ansatz	
	0	100	0	12,5
1	0,9	13,8	0,5	36 h fl
2	1,0	19,3	0,5	36 h fl
3	1,2	20,5	0,5	13 h fl
4	1,2	19,3	0,9	15 h fl
5	1,2	34,7	1,1	23 - 36 h
6	1,3	50,	1,2	1,5- 14 h
7	1,3	6,8	1,3	23 - 36 h
8	1,4	11,0	1,3	19 h fl
9	1,6	7,6	1,5	22 - 26 h
10	1,7	31,	1,7	24 h fl
11	4,7	57,	3,5	gr 35 h
12	4,8	35,	3,6	gr 34 h
13	4,9	57,	4,8	34 h fl
14	4,7	35,	4,9	gr 36 h
15	5,2	49,	6,9	gr 36 h

Zusammenfassend ergibt sich aus den Tabellen 17, 18, 19 folgendes:
Im PSVF reichen 25 γ ACS in allen Fällen (s. Tab. 17)und 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor in den meisten Fällen aus, um die unter SK-Zusatz erreichbare Fibrinolyse im Ansatz weitgehend aufzuheben, sodass die Lysiszeiten, die im inhibitoren-freiem Ansatz zwischen 1 - 4 Minuten liegen, auf Werte über 36 h ansteigen.
Während die Organinhibitoren in dieser Konzentration in allen drei Testen vergleichbare Wirkung zeigen, ist im FTF und im Euglobulinlysistest der Effekt von 100 γ ACS (= Vierfache der Menge im PSVF) geringfügig.

Im Thrombelastogramm zeigt sich bei Vergleich der Inhibitorenwirkungen im TEG-P_{16}SF und am Fibrinogen-Thrombingerinnsel prinzipiell das gleiche Ergebnis, wie aus den Abbildungen 8 und 9 ersichtlich.

Abbildung 8 zeigt die TEG-Veränderungen nach Zusatz von 25 γ ACS (Fig. 2), 50 K.I. Einh. Trasylol (Fig. 3) oder 50 K.I. Einh. Lungeninhibitor (Fig. 4) auf SK-induzierte Hyperfibrinolyse im TEG-P_{16}SF (16 SK-Einh./Ans.).

In Abbildung 9 dagegen ist die Wirkung von 100 γ ACS (Fig. 2) und 12,5 K. I. Einh. Organinhibitor (Trasylol) auf Plasmininduzierte (250 γ Plasmin/Ans.) Fibrinolyse im Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel aufgezeigt. Die minimale ACS-Wirkung in diesem Ansatz wurde auch bei Verwendung von Streptokinase als Proteolytikum und von Humanfibrinogen anstelle von Rinderfibrinogen festgestellt.

Vergleicht man den Hemmungseffekt in Abbildung 8 und 9 bei Beachtung der Inhibitorenansatzkonzentrationen (TEG-P_{16}SF und Fibrinogen-Thrombin Gerinnsel haben nicht gleiche Ansatzvolumen), so ergibt sich folgendes:

Tabelle 20

Inhibitor	Abbildung 8			Abbildung 9		
	Fig. Nr.	Inhib. Menge/ccm	Effekt	Fig. Nr.	Inhib. Menge/ccm	Effekt
-	1	-	-	1	-	-
ACS	2	69,4 γ	+++	2	227 γ	(+)
Trasylol	3	139 K.I.E.	+++	3	28,4 K.I.E.	+++
Lungeninh.	4	139 K.I.E.	+++			

Es ist zu sehen, dass im Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel trotz Steigerung der Ansatzkonzentration auf etwa das Dreifache, die ACS-Wirkung praktisch verschwindet.

Abb.8 TEG-Pausen

Wirkung von ACS und Organinhibitor auf SK-induzierte Fibrinolyse im TEG-P_{16}SF (s. Text)

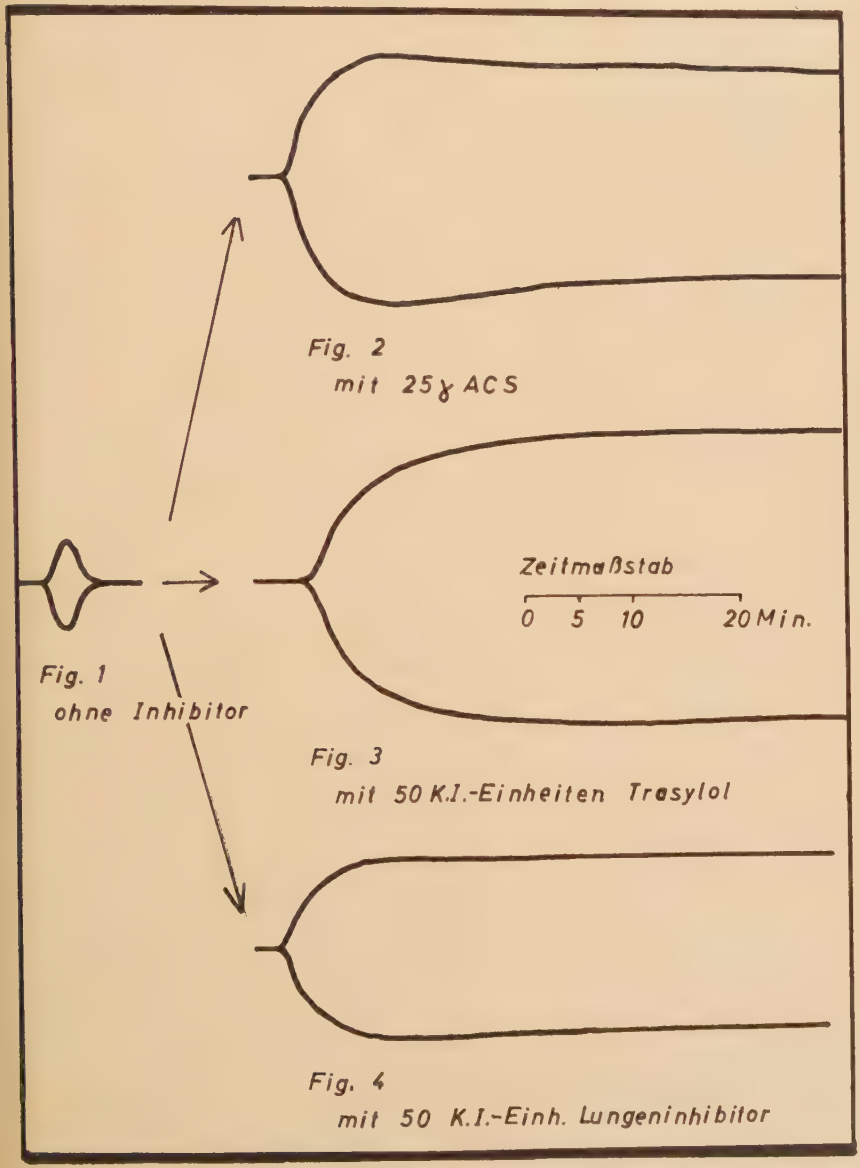
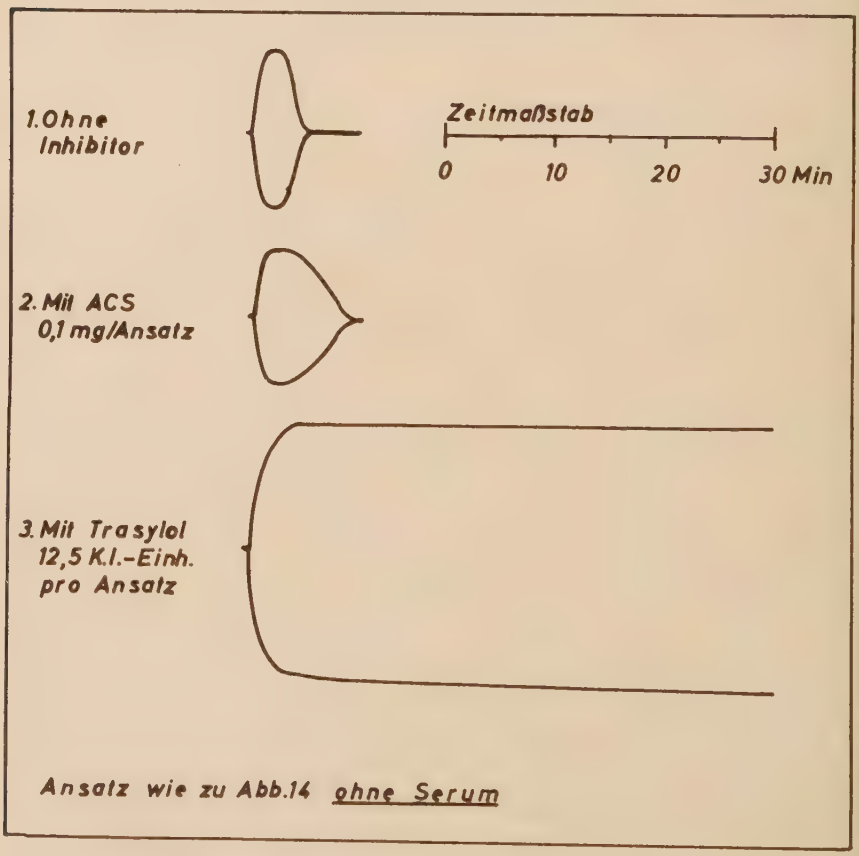


Abb.9 TEG-Pausen
Ausmaß der Fibrinolyse-Hemmung durch ACS u. Organinhibitor im Rinder-Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel mit 0,25mg Plasmin pro Ansatz.



War die ACS-Wirkung auch in den einzelnen Testen (Euglobulinlysistest, FTF und TEG (Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel)) schwach, so konnte sie doch konstant beobachtet werden. Der Nachweis gelang um so deutlicher, je geringer die Lysisintensität im Ansatz gewählt wurde. Durch Verminderung der Proteolytikumkonzentration werden einmal die Lysisvorgänge verlangsamt, zum anderen aber wird die Empfindlichkeit des Testes gegenüber fibrinolysehemmender Einflüsse gesteigert. Dieses geht aus Abb. 10 und Tab. 21 hervor.

Es wurden bei abnehmenden Plasminzusätzen (250 - 31,2 γ/Ans.) jeweils 2 TEG-bestimmungen ausgeführt, nämlich eine ohne Inhibitorenzusatz = Leerwert (Fig. 1 - 4) und eine mit 100 γ ACS/Ansatz. (Fig. 1a - 4a).

Die Verzögerung der Lysisvorgänge bei abnehmenden Plasminmengen ist sichtbar. Die Veränderungen in Fig. 1a - 4a sind stärker als in Fig. 1 - 4.

Gibt man (s. Tab 21 Spalte 6) als Inhibitoreneffekt an, wieviel Prozent die Lysiszeit (bzw. die Fläche) des inhibitorenhaltigen Ansatzes in Bezug auf den zugehörigen Leerwert (= 100 %) ausmachen,

$$\frac{F_2}{F_1} \times 100 = \text{Inhibitoreneffekt}$$

so zeigt sich ein Ansteigen der Prozentzahlen bei Verringerung der Lysisintensität des Ansatzes. (Für die Flächen von 170,5 auf 322,8 % und für $K_{(Lys.tot)}$ von 172,4 auf 360,8 %).

Die Zunahme der relativen Wirksamkeit des Inhibitors (100 γ ACS im vorliegenden Beispiel) beweist die Empfindlichkeitssteigerung des Testes, die bei Verringerung der Lysisintensität auftritt.

Tabelle 21 zeigt für die in Abbildung 10 dargestellten Thrombelastogramme das Verhalten der Größen $K_{(Lys.tot.)}$ und F = Fläche bei abnehmenden Plasmin-Ansatzkonzentrationen in Ansatzreihen mit und ohne ACS-Zusatz. (Ausführung im TEG-Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel.)

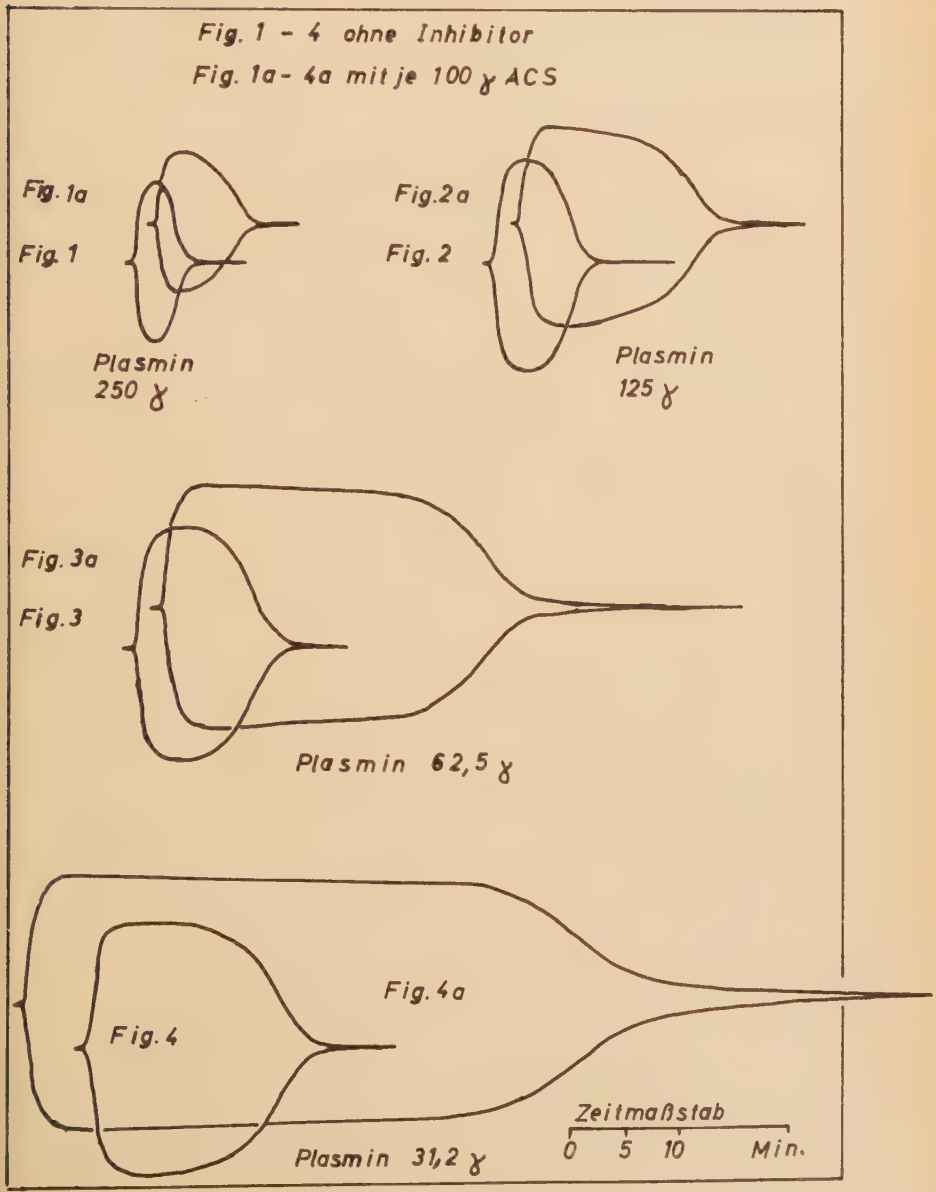
Plasmin γ/Ans.	Fläche F in cm^2 von TEG-Ansätzen				
	ohne Inhibitor		mit Inhibitor 100 γ ACS/Ans.		
	Fig.Nr. Abb.10	F_1 o.Inhib.	Fig.Nr. Abb.10	F_2 m.Inhib.	$\frac{F_2}{F_1}$ x 100
250	1	1,7	1a	2,9	170,5 %
125	2	4,6	2a	10,2	221,7 %
62,5	3	8,0	3a	23,7	297,5 %
31,25	4	14,0	4a	45,2	322,8 %

K. (Lys.tot.) in Minuten von TEG-Ansätzen.

Plasmin γ/Ans.	ohne Inhibitor		mit Inhibitor 100 γ ACS/Ans.		
	Fig.Nr. Abb.10	K_1 o.Inhib.	Fig.Nr. Abb.10	K_2 m.Inhib.	$\frac{K_2}{K_1}$ x 100
250	1	5,8	1a	10	172,4 %
125	2	10,	2a	24	240,0 %
62,5	3	15,5	3a	46	296,8 %
31,25	4	23,	4a	83	360,8 %

Es ergaben sich aus den Beziehungen zwischen Testempfindlichkeit und Lysisintensität zwei Folgerungen:
Erstens kann man die Testempfindlichkeit den jeweiligen Versuchszielen anpassen, z. B: Nachweis geringer Inhibitorenmengen im Tierversuch (s. u.).
Zweitens soll zur Vermeidung zusätzlicher Fehler in möglichst konstanten Empfindlichkeitsbereichen gearbeitet werden.

Abb.10 zeigt in TEG-Pausen die Wirkung von 100 γ ACS auf Plasmin-induzierte(250-31γ/Ans.) Fibrinolyse im Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel



Da zur Angabe der Lysisintensität eines Ansatzes nach den Ergebnissen in Tab. 3 die Proteolytikum-konzentration nicht geeignet ist, wurde hierzu die Lysiszeit des inhibitorenfreien Ansatzes (= Leerwert) herangezogen, die in den folgenden Versuchen durch geeigneten Plasmin- oder SK-zusatz auf Werte zwischen 1,5 bis 3 Minuten eingestellt wurde.

b) Bestimmung äquivalenter Inhibitorenmengen von ACS und Organinhibitor (Trasylol).

Wegen der oben nachgewiesenen, je nach verwendetem Test unterschiedlichen Wirksamkeit von ACS wurde, in Berücksichtigung etwaiger späterer therapeutischer Verwendung der Inhibitoren, die Bestimmung äquivalenter Inhibitorenmengen nur im PSVF durchgeführt. Dieser Test scheint den natürlichen Verhältnissen am nächsten zu kommen. Es wurden eine Versuchsreihe mit steigenden ACS-und eine weitere mit steigenden Organinhibitoren-(Trasylol)- Konzentrationen (beide mit Doppelbestimmungen) ausgeführt. Die mittleren Lysiszeiten zweier Parallelbestimmungen wurden in Bezug auf die im Ansatz enthaltenen Inhiborenkonzentrationen graphisch dargestellt (Abszisse = steigende Inhibitorenkonz., Ordinate = steigende Lysiszeiten in Min.). An Hand der so gewonnenen Kurven ließen sich für Lysiszeiten zwischen 2 - 20 Minuten äquivalente Mengen von ACS und Organinhibitor bestimmen.

Tabelle 22 zeigt äquivalente Mengen ACS und Organinhibitor (Trasylol), bestimmt im PSVF mit 5o SK-Einh. im Ansatz. Den K.I.Einheiten (Spalte 1) entsprachen in den Versuchen 1-4 folgende ACS-Konzentrationen (Spalten 2-5)

K.I.Einh./Ans. (Trasylol)	ACS (γ/Ansatz) in den Versuchen 1	2	3	4
0,5		2,5	0,5	1,0
1,0		4,0	0,5	2,0
1,5		4,5	1,0	3,0
2,0	2,3	5,0	1,2	3,6
2,5	3,0	5,5	1,5	4,5
3,0	4,2	6,0	1,8	5,0
3,5	5,0	6,3	2,0	5,5
4,0	5,5	6,8	2,2	6,0
4,5	6,3	8,3	2,5	6,8
5,0	6,8		3,0	7,5
5,5	7,0		3,5	8,3
6,0	8,3		4,2	9,0
6,5	10,0		5,0	
7,0	13,0		7,5	

Die Tabelle zeigt in den einzelnen Versuchsreihen, dass unterschiedliche ACS-Mengen nötig sind, um die Wirkung bestimmter Organinhibitoren-konzentrationen zu erreichen. So entsprechen z.B. drei K.I.Einheiten Organinhibitor 4,2; 6,0; 1,8; 5,0 γ ACS. Diese Ungenauigkeit ließ den PSVF für weitere solcher Bestimmungen als ungeeignet erscheinen.

Als grobe Angabe über äquivalente Inhibitorenmengen kann somit nur soviel gesagt werden, dass im PSVF 25 γ ACS oder 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor

jede SK-induzierbare Fibrinolyse weitgehend aufheben, während im Hasenversuch (Nativblut-TEG) 200 mg ACS oder 10 000 K.I.Einheiten Organinhibitor die Wirkung von 16 000 SK-Einheiten (Varidase) weitgehend kompensieren.

c) Wirksamkeit von Mischungen aus ACS und Organinhibitoren auf SK-induzierte Hyperfibrinolyse in vitro.

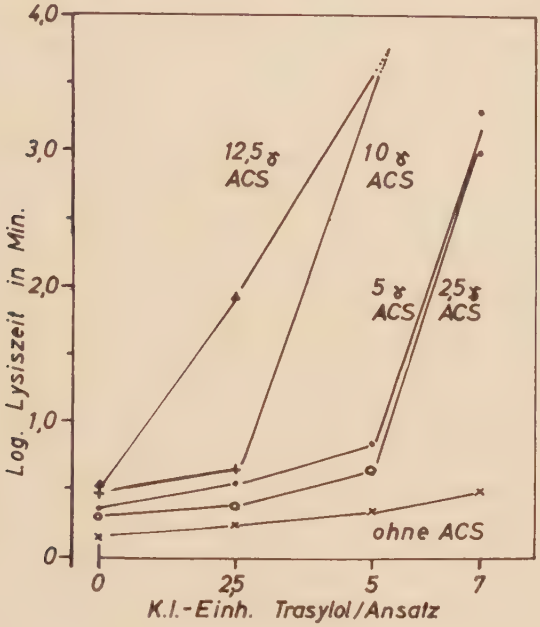
Diese Versuche wurden nur im PSVF ausgeführt. Bei der geringen ACS-Wirkung waren im FTF oder Euglobulinlysis-test kaum Aussagen zu erwarten. Im PSVF wurde eine Anzahl von Versuchsreihen steigender ACS-Konzentrationen (0 - 20 γ/Ans.) durchgeführt, denen zusätzlich unterschiedliche Mengen Organinhibitor (0; 2,5; 5; 7 K.I.Einheiten) zugefügt waren.

Tabelle 23 zeigt Lysiszeiten in Minuten für Ansätze mit 50 SK-Einh. bei zunehmender ACS-Konzentrationen und steigenden K.I.Einh. Organinhibitor (Trasylol).

ACS-Konz. γ/Ans.	K.I. Einheiten Organinhibitor im Ansatz. 0	2,5	5	7
0	1,4	1,7	2,0	3,0
2,5	2,0	2,4	4,4	20-36 h
5,0	2,3	3,4	6,8	20-36 h
7,5	3,3	4,6	20-26 h	gr 36 h
10,0	3,8	4,8	gr 36 h	gr 36 h
12,5	3,2	92	gr 36 h	gr 36 h
15,0	4,7	220	gr 36 h	gr 36 h
20,0	5,5	gr 36 h	gr 36 h	gr 36 h

Die Tabelle lässt erkennen, dass sich die Inhibitoren in ihrer Wirkung addieren, besonders bei höheren Inhibitoren-Ansatzkonzentrationen.

Abb.11 Verhalten der Lysiszeiten im PSVF (50 SK-Einh./Ansatz) bei steigender Organinhibitor - Konzentration (Ansatzreihen mit 0; 2,5; 5; 10; 12,5 γ ACS/Ansatz)



Ansatz in Reihenfolge der Zugabe

o,o5 ccm ACS-Lösung (verschiedene Konzentrationen)
o,1o ccm Serum (1:1 Plasma - $CaCl_2$ m/4o)
o,o6 ccm einer Mischung aus
o,o4 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
+ o,o2 ccm Lösung von Organinhibitor (Trasylol)
(verschiedene Konzentrationen)
o,o5 ccm SK-Lösung 1ooo Einh./ccm (Bistreptase)
o,1o ccm Citratplasma 1:5

Die Werte aus Tabelle 23 sind teilweise in Abbildung 11 verwendet. Hier sind die Beziehungen zwischen Lysiszeit (Ordinate: dek. Log.) und steigenden Organinhibitoren-Ansatzkonzentration (Abszisse) dargestellt, wobei den Versuchsreihen jeweils verschiedene Mengen ACS zugesetzt sind. Der Einfluss der ACS—Mengen auf den Kurvenverlauf ist deutlich.

Die gegenseitige Ergänzung von ACS und Organinhibitor (Trasylol) könnte einer einfachen Addition, oder aber einer Superaddition der Wirkungen der einzelnen Inhibitoren entsprechen. Um dies zu entscheiden, wurden im PSVF unter verschiedenen Versuchsbedingungen, sei es hinsichtlich SK-Konzentration oder absoluter Inhibitorenmenge, in einer Reihe von Versuchen jeweils äquivalente Mengen von ACS und Organinhibitoren (Trasylol) bestimmt. Jeweils die Hälfte äquivalenter Inhibitorenmengen wurde als Mischung dem Ansatz zugegeben. Das Verhalten der Lysiszeiten ist aus Tabelle 24 zu ersehen.

Tabelle 24 zeigt gesteigerte Wirksamkeit von Inhibitorenmischungen (ACS und Organinhibitor (Trasylol) gegenüber vergleichbaren Mengen reinen Inhibitors. (Spalte 2 - 4 geben die Mittelwerte von Lysiszeiten in Minuten aus je 2 Parallelbestimmungen wieder.)

Vers. Nr.	Lysiszeiten in Minuten in Ansätzen mit				
	ACS	Trasylol	$\frac{\text{ACS + Trasylol}}{2}$		$\frac{A}{B} \times 100$
			gemessen (A)	errechnet (B)	
1	1,3	1,4	1,5	1,35	112,5 %
2	2,3	1,7	2,8	2,0	140 %
3	2,3	1,9	2,6	2,1	124 %
4	2,5	2,2	2,9	2,35	123,5 %
5	2,8	2,4	4,7	2,6	181 %
6	2,7	2,6	4,3	2,65	162 %
7	3,8	2,6	5,7	3,2	178 %
8	3,3	3,3	6,9	3,3	209 %
9	3,6	3,5	4,7	3,55	133 %
10	3,6	3,4	3,4	3,5	97 %
11	3,9	3,9	6,1	3,9	156,5 %
12	5,7	5,0	gr 132	5,35	2460 %
13	5,9	5,8	215	5,85	3670 %
14	11,0	7,8	gr 2700	9,4	gr 29400 %
15	4,2	15,0	gr 2160	9,6	gr 22500 %
16	10,6	8,9	gr 2600	9,75	gr 26700 %
17	13,3	17,0	gr 4080	15,15	gr 27000 %

Aus Tabelle 24 ist ersichtlich, dass die Lysiszeiten nach Zusatz von Inhibtorenmischungen höher liegen, als bei Verwendung von reinen Inhibitoren. Diese Wirkungssteigerung von Inhibitorenmischungen ist um so deutlicher, je höher die absoluten Lysiszeiten, bzw. je geringer die Lysisintensitäten gewählt waren.

Dabei scheint es gleichgültig, ob die längeren Lysiszeiten durch geringe Proteolytikums- oder durch relativ hohe Inhibitoren-Ansatzkonzentrationen bedingt sind. Die Tabelle 24 beweist, dass sich die Inhibitoren im Sinne einer Superaddition ergänzen.

Somit sind die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen zur Hemmung und Aktivierung der Fibrinolyse:

1) Die Bestätigung der antifibrinolytischen Wirkung von ACS und Organinhibitoren.
2) Der Nachweis der unterschiedlichen Wirksamkeit von ACS in den einzelnen Methoden.
3) Der Nachweis der gesteigerten Wirksamkeit von Inhibitorenmischungen.

Im folgenden Abschnitt wird die Wirkung von Antikoagulantien auf Gerinnung und Fibrinolyse untersucht.

III. Einfluss von Antikoagulantien auf Gerinnung und Fibrinolyse im PSVF.

In den folgenden Versuchen, die nur im PSVF ausgeführt wurden, fanden als Antikoagulantien ein Alpha-Heparin (= Heparin-Novo) und Heparin G. 31 150 Verwendung. Zwei Fragen sollen beantwortet werden:

1) Welche Wirkung zeigen die Antikoagulantien auf die Gerinnung und Fibrinolyse im PSVF.
2) Beeinflussen ACS und Organinhibitoren die Antikoagulantien-wirkung.

Die zweite Frage scheint wichtig für evtl. therapeutische Verwendung der Inhibitoren bei Zuständen von Hyperfibrinolyse im heparinisierten Blut [z. B. Extracorporaler Kreislauf (Lit. 20; 21)].

A) Vorbemerkung zur Zeitmessung im heparinisierten Ansatz.

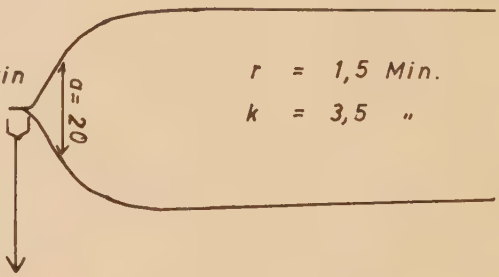
Antikoagulantien bewirken in höherer Ansatzkonzentration Schwierigkeiten bei der Gerinnungs- und Lysiszeitbestimmung. Es verlängert sich die Gerinnselbildungszeit = (Zeitspanne vom Auftreten der ersten Fibrinfäserchen bis zur völligen Durchgerinnung). Die Verzögerung der Gerinnselentsteheung kann am Thrombelastogramm gut gezeigt werden. In Abbildung 12 sind 2 TEG-Figuren abgebildet, die im proteolytikumfreien TEG-P_{16}SF ohne (Fig. 1) und mit Zusatz (Fig. 2) von 0,24 I. Einh. Heparin gewonnen wurden. Besonders deutlich lassen sich die Veränderungen aus den beigefügten Photographien ersehen. Diese zeigen Ausschnitte aus dem Original-Thrombelastogramm unter Lupenvergrößerung.

Bei derartig langen Gerinnselbildungszeiten (Abb. 12 Fig. 2) ist der Zeitpunkt sowohl des Auftretens eines ersten Fibrinfäserchens, als auch der völligen Durchgerinnung -(ersterer, weil der Hauptteil des Fibrins noch nicht entstanden ist, letzterer, weil ein Teil des Fibrins schon aufgelöst wird, bevor die Lysiszeitmessung beginnt) - ungeeignet zur Markierung von Abschluss der Gerinnungs- und Anfang der Lysiszeit.
Die antikoagulatorische Heparin-Wirkung kann zwar durch Protaminsulfat oder Thrombin aufgehoben werden, doch setzt man damit dem Test weitere Substanzen mit Eigenwirkung auf Gerinnungs- und Fibrinolyse-abläufe zu. (S. z. B. antikoagulatorische + antifibrinolytische Wirkung von Protaminsulfat).

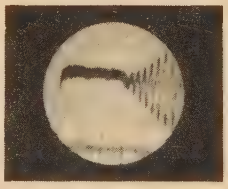
Außerdem ist unklar, ob durch diese Substanzen (Protaminsulfat oder Thrombin) vom Heparin(oid) nur die Wirkung als Antikoagulans oder auch Nebenwirkungen, fibrinolysehemmender oder fibrinolysebeschleunigender Art, verdeckt werden.

Abb. 12 zeigt in TEG-Pausen die Zunahme der Größen „r" und „k" nach Heparinzusatz im TEG. (Ansatz s. Text)

Fig. 1
ohne Heparin

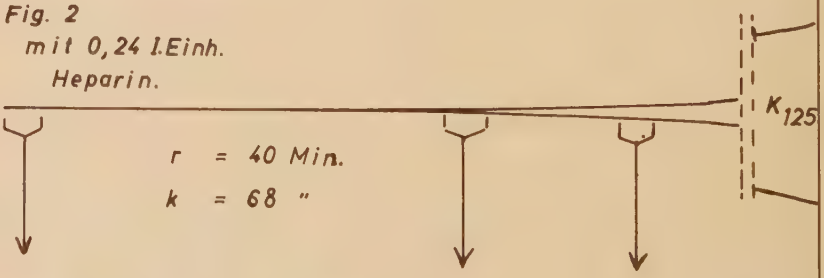


r = 1,5 Min.
k = 3,5 „

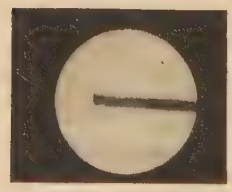


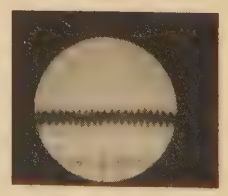
Zeitmaßstab
1. TEG-Fig. 0 5 10 Min.
2. Photo. 0 1 2 3 Min.

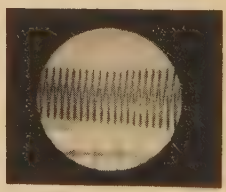
Fig. 2
mit 0,24 I.Einh. Heparin.



r = 40 Min.
k = 68 „







Aus diesen Gründen wurde Protaminsulfat nicht verwendet. Die Ergebnisse, die nach Zusatz von Thrombin gewonnen wurden, sind unter diesen Einschränkungen zu beurteilen, wenn auch bei den verwendeten Thrombinmengen keine Beeinflussung des Fibrinolyse-geschehens festgestellt werden konnte.

Tabelle 25 zeigt im PSVF mit 25 SK-Einh./Ans. das Verhalten von Gerinnungs- und Lysiszeiten bei steigenden Protaminsulfatkonzentrationen.

Protaminsulfat γ/Ansatz	0	19,5	39	78	156
Ger.-Zeit sec.	53,2	76,9	95,3	123	174,9
Lys.-Zeit Min.	2,0	2,1	3,1	3,2	4,5

B) Gerinnungszeiten im PSVF nach Antikoagulantien-zusatz.

Die Gerinnungszeitveränderungen nach steigenden Heparin (oid)-zusatz sind aus zwei typischen Versuchen aus Tabelle 26 zu entnehmen. Die Zahlen in Klammern bedeuten Gerinnselbildungszeiten (= Zeitspanne vom Auftreten der ersten Gerinnselfäden bis zur völligen Durchgerinnung des Ansatzes.)

Tabelle 26 zeigt die Einwirkung von Heparinoid G 31 150 und Heparin-Novo auf die Gerinnungszeiten im PSVF (ohne Thrombinzusatz).

Zusatz von Heparinoid		Zusatz von Heparin	
γ/Ans.	Gerinnungszeit sec.	Einh./1000 / Ans.	Gerinnungszeit sec.
-	48,7	-	50,5
0,24	50,5	15,2	52,5
0,48	54,6	30,5	66,5
0,97	65,3	61,	125, (+ 15)
1,95	87,4	122,	197, (+ 30)
3,9	146,8	244,	445, (+ 120)
7,8	330, (+ 180)	488,	30 Min (+ 20 Mi
15,6	480 (+ 220)	976,	gr 120 Min

Bei Zusatz von 3,5 NIH-Einheiten Thrombin bewirken die verwendeten Antikoagulantien nur geringe Veränderungen der Gerinnungszeiten.

Tabelle 27 zeigt das Verhalten der Gerinnungszeiten unter steigenden Heparinoid-konzentrationen im PSVF (mit 3,5 NIH-Einheiten Thrombin im Ansatz).

Heparinoid-Konzentrationen γ/Ansatz									
0	0,48	1,95	3,9	7,8	15,6	31,3	62,5	125	250
Gerinnungszeit sec.									
4,2	4,3	8,9	9,2	10,9	16,8	23,1	16,4	15,2	12,2

Trotz erheblich höherer Heparinoid-Ansatzkonzentrationen als in Tabelle 26 wurden Gerinnungszeiten über 24 sec. nicht erreicht.

C) Einfluss von ACS und Organinhibitor (Trasylol) auf die antikoagulatorische Wirkung von Alpha-Heparin und Heparinoid.

Die Gerinnungszeitveränderungen nach Heparin(oid)-zusatz zum thrombinfreien PSVF wurde in 3 Versuchsreihen (ohne Inhibitor, mit 100 γ ACS/Ans.; mit 50 K.I.Einh. Organinhibitor (Trasylol/Ans.)verfolgt. Die Ergebnisse eines typischen Versuches sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Ansatz: 0,04 ccm $CaCl_2$ 1,29 % + 0,10 ccm phys. Kochsalzlsg., oder Inhibitorenlsg. + 0,10 ccm Serum 1:1 + 0,02 ccm Antikoagulantienlsg steigender Konzentrationen, + 0,10 ccm Plasma.

Tabelle 28 zeigt im thrombinfreien PSVF-Ansatz den Einfluss von 100 γ ACS oder 50 K.I.Einheiten Organinhibitor (Trasylol) auf Heparin(oid)- bedingte Gerinnungszeitveränderungen.

Heparinoid γ/Ans.	Gerinnungszeit in sec. von Ansätzen		
	ohne Inhibitor	mit 100 γ ACS	mit 50 K.I.Einh.
-	44,3	46,6	51,0
0,98	65,4	71,2	57,2
1,95	95, (+ 15)	90, (+ 15)	63,2
3,9	149, (+ 80)	153, (+ 60)	69,7
7,8	220, (+100)	240, (+ 90)	112, (+ 15)
15,6	14,5Min(+4Min)	13,5Min(+4Min)	4,6Min(+1,7Min)

Heparin Einh/1000/Ans.	Gerinnungszeit in sec. von Ansätzen		
	ohne Inhibitor	mit 100 γ ACS	mit 50 K.I.Einh.
-	67,2	69,9	73,1
6,1	117, (+ 15)	122, (+ 20)	70,
12,2	383, (+ 60)	340, (+ 90)	73,9
24,4	12 Min(+2,5 Min)	11,6 Min(+2,5 Min)	74,0

In den einzelnen Versuchsreihen ist die antikoagulatorische Wirkung von Heparin(oid) deutlich, doch ist sie nach Organinhibitoren-zusatz geringer. Der Organinhibitor (Trasylol) hat demnach einen ähnlichen Effekt auf Heparin(oid) wie Protaminsulfat. Allerdings tritt diese Wirkung erst bei hohen Ansatzkonzentrationen auf, die weit über den Inhibitorenmengen liegen, die im gleichen Ansatz antifibrinolytisch wirksam sind. Prinzipiell gleiche Ergebnisse ergaben sich im FTF.

D) Nachweis der antifibrinolytischen Wirksamkeit von Alpha-Heparin und Heparinoid.

Die Frage nach der Beeinflussung der Lysisvorgänge durch Antikoagulantien wird in der Literatur unterschiedlich beantwortet. Ist einerseits eine thrombolyse-beschleunigende Wirkung von Heparin beschrieben (Lit. 22; 23; 24), so wird andererseits auf dessen antifibrinolytische Komponente hingewiesen (Lit. 1; 3;25).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein geringer fibrinolysehemmender Effekt von Heparin und Heparinoid festgestellt.

Tabelle 29 zeigt die Gerinnungs- und Lysiszeitverlängerung bei steigenden Heparin(oid)-Konzentrationen im thrombinfreien PSVF (ausgeführt mit 12,5 SK-Einh./Ans.).

Heparinoid γ/Ans.	Ger.-Zeit in sec.	Lys.Zeit Min.	Heparin $\frac{\text{Einh}}{1000}$/Ans	Ger.Zeit sec.	Lys.Zeit Min.
-	42,9	2,4	-	60,4	2,8
0,49	47,9	2,7	12,2	66,0	3,0
0,98	71,1	2,8	24,4	85,0	3,8
1,95	83,0	3,3	48,8	145,(+60)	7,5
3,9	130,(+ 15)	4,6	97,6	308,(+180)	11,8
7,8	360,(+150)	10,5			

Die Zahlen in Klammern bedeuten Gerinnselbildungszeiten. Mit der Lysiszeitmessung wurde bei Auftreten der ersten Fibrinfäserchen begonnen. Das Ansteigen der Gerinnungs- und Lysiszeiten nach Heparin(oid)-zusatz ist deutlich.

Der Anstieg der Gerinnungszeiten ist als eine direkte Einwirkung der Antikoagulantien anzusehen. Die Lysiszeitverlängerung kann durch eine primäre oder sekundäre Verlangsamung der Fibrinolyseabläufe bedingt sein. Als Möglichkeiten sekundärer Hemmungseffekte sind denkbar: erstens Struktur- und Qualitätsunterschiede des Fibrins und zweitens Manifestation plasma-eigener Inhibitoren (Progressivantiplasmin s. Tab. 10). Struktur- und Qualitätsunterschiede sind deswegen anzunehmen, da mit steigenden Heparin-ansatzkonzentrationen die sichtbare Gerinnseldichte abnimmt. Die durch steigende Gerinnungszeiten verursachte Fibrinolysehemmung und die Veränderungen der Gerinnseldichte in stark heparinisierten Ansätzen, lassen sich durch Thrombinzusatz als Fehlerquellen weitgehend ausschalten.

Tabelle 30 zeigt im PSVF (ausgeführt mit 3,3 NIH-Einh. Thrombin und 6,25 SK-Einh. im Ansatz) das Verhalten der Gerinnungs- und Lysiszeiten bei Zusatz steigender Mengen Heparinoid.

Heparinoid γ / Ans.	Gerinnungszeit sec.	Lysiszeit
-	4,1	4,2
0,49	5,3	4,9
0,98	6,9	4,7
1,95	6,6	5,6
3,9	5,6	6,4
7,8	6,6	7,0
15,6	6,2	8,8
31,2	6,3	9,1

Da in Tabelle 30, trotz weitgehender Konstanz der Gerinnungszeiten die Lysiszeiten unter Heparin(oid)-zusatz ansteigen, kann angenommen werden, daß die Antikoagulantien eine antifibrinolytische Wirkungskomponente besitzen. Diese Heparinwirkung verstärkt die Wirkung gleichzeitig zugesetzter anderer Fibrinolyseinhibitoren.

Tabelle 31 a, b zeigt von Ansatzreihen mit und ohne Inhibitorenzusatz die Lysiszeitveränderungen unter steigenden Antikoagulantienkonzentrationen.
(Test: PSVF mit 12,5 SK-Einh./Ans. und ohne Thrombinzusatz)

Teil a: Heparinoid als Antikoagulans.

Heparinoid γ /Ans.	Lysiszeit in Minuten von Ansätzen	
	ohne Inhibitor	mit 10 γ ACS
-	2,4	10,0
0,49	2,7	10,9
0,98	2,8	11,5
1,95	3,3	12,7
3,9	4,6	15,4
7,8	10,5	24,4

Teil b: Heparin als Antikoagulans.

Heparin $\frac{\text{Einh.}}{1000}$/Ans.	Lysiszeit in Minuten von Ansätzen	
	ohne Inhibitor	mit 10 γ ACS
-	2,8	11,3
12,2	3,0	13,3
24,4	3,8	14,1
48,8	7,5	18,4
97,6	11,8	34,4

Prinzipiell gleiche Ergebnisse erhält man bei Verwendung von Organinhibitoren oder bei Ausführung des PSVF mit Thrombinzusätzen.

Auch im Tierversuch konnte mit Hilfe des Misch-PSVF (Ausführung s. u.) der antifibrinolytische Effekt von Heparin und Heparinoid nachgewiesen werden. Dem Versuchstier wurden schnell hintereinander das Proteolytikum (Streptokinase) und das Antikoagulans intravenös injiziert. Die vor, zwischen und nach den beiden Injektionen entnommenen Citratblutproben (1:5) wurden im Misch-PSVF verwendet. In der folgenden Tabelle sind die Gerinnungs- und Lysiszeiten der Plasmen (P_2 =(Plasma, gewonnen nach SK-Injektion) und P_3 =(Plasma, gewonnen nach Antikoagulantien-Injektion) zusammengestellt.

Tabelle 32 zeigt im Misch-PSVF und im Kaninchen-PSVF die fibrinolysehemmende Wirkung von intravenös applizierten Heparin und Heparinoid auf SK-induzierte Fibrinolyse beim Kaninchen. Test und zugesetzte Streptokinase (SK)- und Thrombin (Th)-mengen sind aus Spalte 1 zu entnehmen.

Test:	Gerinnungszeit sec.b.Verwendung von		Lysiszeit Min. b. Verwendung von	
	P_2	P_3	P_2	P_3
Versuch Nr. 1: Injektion von 10000 SK-Einh.(Varidase) + 0,10 g Heparinoid. Hasengewicht 4,3 kg				
Misch-PSVF SK=6,25 E. Th=0,0 E.	76,7	420-780	3,6	gr 150
Misch-PSVF SK=6,25 E.	6,0	29,7	2,3	1,9
Th=1,5 E.	5,9	24,4	2,6	1,8
Hasen-PSVF SK=6,25 E.	5,5	12,5	4,1	6,3
Th=3,0 E.	4,3	10,4	4,2	6,2

Fortsetzung Tabelle 32

Test:	Gerinnungszeit sec.b.Verwendung von		Lysiszeit Min. b. Verwendung von	
	P_2	P_3	P_2	P_3
Versuch Nr. 2: Injektion von 10000 SK-Einh. (Varidase) + 0,05 g Heparinoid. Hasengewicht 3,8 kg				
Misch-PSVF SK=6,25 E.	70,2	360-520	2,2	20,
Misch-PSVF SK=6,25 E.	6,7	13,9	3,0	5,4
Th=2,0 E.	7,5	16,5	2,7	5,4
	5,6	15,0	2,7	5,8
Hasen-PSVF SK=6,25 E. Th=4,0 E.	4,9	70,	3,5	13,6
Versuch Nr. 3: Injektion von 10000 SK-Einh. (Varidase) + 1250 I. E. Heparin. Hasengewicht 4,5 kg				
Misch-PSVF SK=6,25 E.	3,9	660-900	3,7	gr 50 h
Th=2,0 E.	4,1	370-550	4,5	gr 50 h
Misch-PSVF SK=12,5 E.	3,8	67,9	3,3	4,6
Th= 4,0 E.	3,3	64,2	4,1	5,1

Fortsetzung Tabelle 32

Test:	Gerinnungszeit sec.b.Verwendung von		Lysiszeit Min. b. Verwendung von	
	P_2	P_3	P_2	P_3
Versuch Nr. 4: Injektion von 12000 SK-Einh. (Varidase) + 312 I. E. Heparin Hasengewicht 4,3 kg				
Misch-PSVF SK=3,1 E. Th=2,0 E.	4,7	60- 90	4,3	7,5
Misch-PSVF SK=6,25 E.	5,7	60-105	2,2	4,2
Th=2,0 E.	6,4	75-110	2,2	4,6
Hasen-PSVF SK=6,25 E.	5,0	110-170	3,1	5,3
Th=4,0 E.	5,1	100-170	2,9	5,1

In Tabelle 32 sind die Veränderungen, sowohl der Gerinnungs- als auch Lysiszeiten nach Heparin(oid)-Injektion deutlich. Das Ausmaß dieser Veränderung ist sehr unterschiedlich, je nachdem mit welcher SK= und Thrombin (Th)-Konzentration der Misch= bzw. Tier -PSVF ausgeführt wurde.

Zusammenfassend erscheinen folgende Ergebnisse wichtig:

1) Im PSVF zeigen Heparin ab 0,012 Einh./Ans. und Heparinoid ab 1,0 - 1,5 γ/Ans. eine deutliche antikoagulatorische Wirkung.

2) Diese wird durch hohe Organinhibitoren-Konzentrationen (50 K.I.Einh.Trasylol/Ans.), nicht dagegen durch ACS (100 γ/Ans.) erheblich beeinträchtigt.

3) Für beide Antikoagulantien konnte im PSVF und im Tierversuch (Hase) eine antifibrinolytische Wirkung festgestellt werden, doch erwies sich der antifibrinolytische Effekt von Heparin(oid)-Konzentrationen, die im PSVF noch eine Gerinnung ermöglichten, gegenüber anderen Fibrinolyse-inhibitoren (ACS und Organinhibitoren) als relativ geringfügig.

4) Die antifibrinolytische Wirkung der Antikoagulantien verstärkt bei gleichzeitigem Zusatz anderer Inhibitoren (ACS oder Organinhibitoren) deren Wirkung (s. Tab. 31).

IV. Fibrinogenolyse, ihre Bestimmung und Beeinflussung durch Epsilon-Amino-n-Capronsäure (ACS) und Organinhibitoren.

War bisher Fibrin das Substrat der Proteolytika, so soll in den folgenden Versuchen Fibrinogen deren Wirkung ausgesetzt werden. Der proteolytische Abbau von Fibrin wird als Fibrinolyse, der von Fibrinogen als Fibrinogenolyse bezeichnet.

A) Nachweis der Fibrinogenolyse.

Fibrinogen und Proteolytikum werden bei 37° C miteinander inkubiert. Anschließend wird der Ansatz durch Thrombin zur Gerinnung gebracht und hierdurch das nicht abgebaute Fibrinogen schnell in Fibrin übergeführt. Das so entstandene Gerinnsel wird, da das Proteolytikum im Ansatz wirksam bleibt, wieder aufgelöst. Gerinnungs- und Lysiszeiten könnten zur Erfassung von Fibrinogenolysevorgängen herangezogen werden. Es ist bekannt, dass die Gerinnungszeiten bei fallenden Fibrinogenkonzentrationen im Ansatz ansteigen (Lit. 17; 26), d. h. je weiter der proteolytische Fibrinogenabbau fortgeschritten ist, um-

so höher sind die gemessenen Gerinnungszeiten. Mit Abnahme der Fibrinogenkonzentration vermindert sich aber auch die entstehende Fibrinmenge, sodass deren Lysiszeiten abnehmen müßten. Die Lysiszeitverkürzung bei fortschreitender Fibrinogenolyse ist jedoch nicht konstant messbar. Bei geringen Proteolytikum-ansatzkonzentrationen kommt es sogar zu einem Ansteigen der Auflösungszeiten (s. Tab. 33).

Tabelle 33 zeigt Veränderungen der Gerinnungs- und Lysiszeiten unter steigender Inkubationsdauer in Fibrinogenolysebestimmungen (FTF mit 6,4 SK-Einh./Ans.) mit und ohne Inhibitorenzusatz.

Bestimmung ohne Inhibitorenzusatz			Bestimmung mit 1 K.I.Einh. Organinhibitor (Trasylol)		
Inkub.Zeit Min.	Ger-Zeit sec.	Lys-Zeit Min.	Inkub.Zeit Min.	Ger-Zeit sec.	Lys-Zeit Min.
1	12,0	4,9	1	11,0	6,7
5	11,5	4,8	5	11,4	7,6
10	13,8	3,9	10	11,2	12,7
15	38,6	2,1	15	11,6	18,2
18	gr 180	-	22	13,2	25,
			30	13,6	35,
			45	21,1	48
			60	17,4	52,
			80	18,6	67,

Steigen in der Fibrinogenolysebestimmung ohne Inhibitor die Gerinnungszeiten nach 18 Minuten Inkubationsdauer auf über 180 sec. an, so erreichen sie in Ansätzen mit 1 K.I.Einh. Organinhibitor selbst bei etwa vierfacher Inkubationszeit nur einen Wert um 20 sec. Die Veränderungen der Gerinnungszeiten sind, wenn auch mit graduellen Unterschieden,gleichsinnig. Bei den Lysiszeiten ist das nicht der Fall. Je nach Proteolyseintensität

fallen oder steigen die Lysiszeiten an. Die Ursache dieser Lysisverlangsamung ist unklar. Veränderungen der Fibrinogenkonzentration dürften dabei keine Rolle spielen. Auf Grund dieses Ergebnisses schienen lediglich die Gerinnungszeiten zur Überwachung von Fibrinogenolysevorgängen geeignet.

B) Durchführung der Fibrinogenolysebestimmungen.

1) Fibrinogenolyse im FTF

In einem Reagenzglas wurden in folgender Reihenfolge zusammengegeben:

1,20 ccm Diaethyl-barbitursäure-Puffer ph 7,6
0,80 ccm Zusätze gelöst in phys. Kochsalzlsg.
0,15 ccm Humancitratplasma (1:5)
0,80 ccm Fibrinogenlösung 1,5 %

Nach Wärmeausgleich (2 Min. auf 37° C) Zugabe von

0,40 ccm SK-Lösung (160 SK-Einh./ ccm)

In geeigneten zeitlichen Abständen wurden jeweils 0,335 ccm (1/10 des Großansatzes) dieser Mischung in ein vorgewärmtes Uhlenhuthröhrchen gegeben und mit 0,025 ccm Thrombinlösung (60 NIH-Einh./ccm) zur Gerinnung gebracht. Das gesamte Ansatzvolumen betrug, entsprechend dem FTF, 0,36 ccm.

2) Fibrinogenolyse im Euglobulinlysistest.

Zusammengegeben wurden im Großansatz:

0,80 ccm phys. Kochsalzlsg.
0,50 ccm Inhibitoren in phys. Kochsalzlsg.
1,00 ccm Euglobulin-Pufferlösung ph 7,6 (enthält den Euglobulinniederschlag aus 1 ccm Citrat-Plasma (1:5)

Nach Wärmeausgleich (2 Min. auf 37° C.) Zusatz von

0,50 ccm SK-Lösung (31,25 SK-Einh./ccm).

Jeweils 0,28 ccm dieser Lösung wurde in einem vorgewärmtes Uhlenhuthröhrchen mit 0,05 ccm $CaCl_2$ 1,29 % gegeben und sofort mit 0,02 ccm Thrombinlösung (100 NIH Einh./ ccm) zur Gerinnung gebracht.

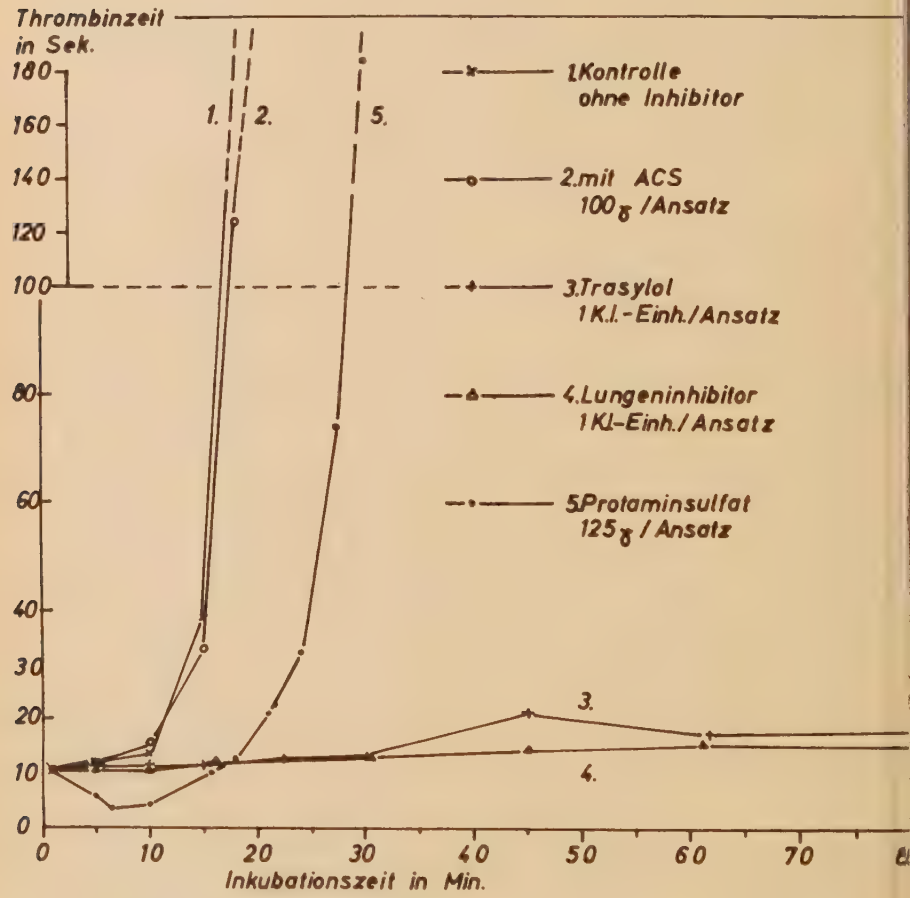
Das Volumen des Gesamtansatzes betrug 0,35 ccm. In den folgenden Versuchen sind als Inkubationszeiten angegeben die Zeitspannen von Zusatz des Proteolytikum zum Großansatz bis zum Einblasen der Thrombinlösung in den jeweiligen Einzelansatz. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Ansatzvolumen (FTF = 0,36 ccm und Euglobulinlysistest = 0, 35 ccm).

C) Nachweis fibrinogenolysehemmender Wirkung von ACS und Organinhibitoren (Trasylol und Lungeninhibitor).

In den hierzu ausgeführten Versuchen zeigte ACS gegenüber den Organinhibitoren eine nur geringfügige Hemmung der Fibrinogenolyse. Dieses geht aus Abb. 13 hervor. Hier sind die Gerinnungszeitveränderungen bei steigender Inkubationsdauer in inhibitorenfreien (Kurve 1) und in ACS-haltigen (Kurve 2) Bestimmungen fast identisch, während nach Zusatz von Organinhibitor (Trasylol = Kurve 3 und Lungeninhibitor = Kurve 4) zum Ansatz die fibrinogenolysebedingte Gerinnungszeitsteigerung weitgehend aufgehoben wird. (Vgl. auch Tab. 33, in der einige Werte, die in Abb. 13 verwendet wurden, aufgeführt sind.)

Berücksichtigt man, dass im PSVF 25 γ ACS wirkungsmäßig etwa 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor entsprechen, beachtet man weiterhin, dass schon eine K.I.Einh. Organinhibitor die Fibrinogenolyse erheblich, 100 γ ACS dagegen kaum beeinflussen, (wenn also das Verhältnis Organinhibitor (in K.I.Einh.) zu ACS (in γ) im PSVF 1:2, bei der fibrinogenolysehemmenden Wirksamkeit im FTF und Euglobulinlysistest 1: größer als 100 ist), so ist der enorme Unterschied der Wirksamkeit der beiden Inhibitoren aufgezeigt.

Abb.13 Fibrinogenolyse-Hemmung im FTF durch ACS und Organinhibitor



Durchfuhrung:

Ansatz: 1,2 ccm Barbitursäure-Puffer pH 7,6
0,15 ccm Human-Citratplasma
0,8 ccm 0,9% NaCl- oder Inhibitoren-Lsg.
0,8 ccm Rinderfibrinogen-Lsg. (1,5%)
2 Min. Wärmeausgleich auf 37° C
0,4 ccm SK-Lsg. (Bistreptase 160 SK-Einh./ccm)

Nach verschiedenen Inkubationszeiten werden jeweils 0,335 ccm entnommen und mit 0,025 ccm Thrombin-Lsg. (60 NIH-Einh./ccm) zur Gerinnung gebracht.

Die im Vergleich zu Organinhibitoren geringfügige fibrinogenolysehemmende Wirksamkeit von ACS lässt sich konstant nachweisen (s. Tab. 34 Teil A). Hier sind die Ergebnisse mehrerer Fibrinogenolysebestimmungen zusammengestellt, wobei unter gleichen Versuchsnummern in Teil A und B der Tabelle die Werte vergleichbare Versuchsreihen geführt sind.

Tabelle 34 Teil A zeigt für inhibitorenfreie und ACS-haltige Fibrinogenolysebestimmungen in den Spalten 2 und 4 die Gerinnungszeiten, gemessen nach einer Inkubationszeit von 1 Minute, in den Spalten 3 und 5 die Inkubationsdauer, innerhalb der die Gerinnungszeiten auf über 180 sec. ansteigen.

ers. r.	Fibrinogenolysebestimmungen, durchgeführt				ACS γ/Ans.
	ohne Inhibitorzusatz		mit ACS - Zusatz		
	Ger-Zeit sec. (Ink-Z.=1)	Inkub-Zeit Min. (Ger-Z. 180)	Ger-Zeit sec. (Ink-Z.=1)	Inkub-Zeit Min. (Ger-Z. 180)	
est:	FTF				
1	10,8	15	9,0	25	5
			9,5	21	100
2	12,6	26	11,1	38	5
			14,6	30	100
3	12,0	18,1	10,9	21	100
4	15,8	7,3	15,1	12	100
est:	Euglobulinlysistest				
5	3,8	7	3,7	9,8	100
	5,6	7	4,3	9,1	100
6	6,0	9,4	5,4	13,3	100
7	4,9	11,3	5,2	14,3	100
8	4,0	11,5	3,9	gr 25,	100
9	4,9	6,3	4,9	17,5	100

Tabelle 34 Teil B zeigt für Bestimmungen mit Organinhibitoren die Gerinnungszeiten nach einer Inkubationsdauer von 1 Minute und zu Abbruch der Bestimmungen.

Vers. Nr.	Fibrinogenolysebestimmungen mit Organinhibitorenzusatz			
	Ger-Zeit sec. (Ink-Zeit=1)	Abbruch der Bestimmung bei Inkub-Zeit. Min.	Ger-Zeit b.Abbruch, sec.	K.I.Einh. Ans. L=Lungeninh. T=Trasylol
Test: FTF				
2	12,2	46,2	36,0	0,78 T
	13,2	47	16	4,37 T
	13,1	47	17	0,78 L
	12,4	47,5	18,1	4,37 L
3	11,0	81	18,6	1,0 T
	10,5	80	15,6	1,0 L
4	11,2	60	10,2	12,5 T
Test: Euglobulinlysistest				
5	4,3	11,0	gr 180	0,78 T
	4,5	60,	4,4	3,13 T
	3,4	60,	4,9	12,5 T
6	4,6	60,	15,0	1,56 T
9	3,7	45	5,2	12,5 T

Als Proteolytikum wurde in den verschiedenen Bestimmungen im FTF 6,4 SK-Einh./Ans. (Bistreptase) im Euglobulinlysistest 1,56 SK-Einh./Ans. (Varidase) verwendet.

In Versuchen 4; 8; 9; wurde Plasmin zugesetzt.
Versuch Nr. 4 = 1,25 mg Plasmin/Ans.
Versuch Nr. 8 = 0,16 mg Plasmin/Ans.
Versuch Nr. 9 = 0,63 mg Plasmin/Ans.

Aus Teil A der Tabelle geht hervor, dass nach ACS-Zusatz (5-100 γ) die Inkubationszeiten, die nötig sind, um die Gerinnungszeiten infolge Fibrinogenabbaus auf Werte über

180 sec. ansteigen zu lassen, zunehmen, womit ein fibrinogenolysehemmender Effekt von ACS bewiesen ist. Diese antifibrinogenolytische Wirkung allerdings ist, wie der Vergleich mit den Organinhibitoren zeigt, gering.

V. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Epsilon-Amino-n-Capronsäure und Organinhibitor (Trasylol).

In früheren Abschnitten (s. S. 47 ff.) wurde auf die Unterschiede der ACS-Wirkung in den einzelnen Testen hingewiesen. Weniger die Tatsache, dass ACS im FTF die Fibrinolyse in geringerem Grade als im PSVF hemmt, sondern die Beobachtung, dass diese Wirkungsunterschiede im Gegensatz zu den Organinhibitoren nur für ACS, auftraten, ließ es möglich erscheinen, dass bei der Herstellung gereinigten Fibrinogens (für FTF) Plasmafaktoren verlorengehen, die für die gute ACS-Wirkung im PSVF von Bedeutung sind. Diese Annahme erschien um so wahrscheinlicher, nachdem sich die Inhibitoren im Euglobulinlysistest ebenso verhielten wie im FTF. Dieses ist aus den Tabellen 15; 19; 35 zu entnehmen. Zur Verdeutlichung sind in Tab. 35 die Ergebnisse aus 7 Versuchsreihen wiedergegeben. Es wurde dabei, unter Verwendung jeweils des gleichen Citratplasmas sowohl der PSVF als auch Euglobulinlysistest ausgeführt und in jedem der beiden Teste die Inhibitorenwirkung von 100 γ ACS und 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor (Trasylol) bestimmt.

Tabelle 35 zeigt die Wirkung von 100 γ ACS und 12,5 K. I. Einh. Organinhibitor (Trasylol) im PSVF und im thrombinfreien Euglobulinlysistest. (Die Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Min.)

Vers. Nr.	PSVF			Euglobulinlysistest		
	Inhibitorenmenge/Ans.			Inhibitorenmenge/Ans.		
	o.Inh.	100 γ ACS	12,5 K.I.E	o.Inh.	100 γ ACS	12,5 K.I.E
1	1,2	gr 38 h	25 h fl	1,3	10,9	2-12 h
2	2,0	gr 38 h	gr 38 h	1,2	34,7	19 h fl
3	3,0	gr 38 h	gr 38 h	1,7	30,7	24 h fl
4	3,4	gr 38 h	gr 38 h	0,5	16,3	gr 37 h
5	3,4	gr 38 h	gr 38 h	0,6	16,0	gr 37 h
6	3,9	gr 60 h	25 h fl	1,0	7,9	13 h fl
7	3,8	gr 60 h	25 h fl	0,6	7,4	13 h fl

Der Vergleich der beiden Teste in Tabelle 35 zeigt, dass ganz allgemein die Lysiszeiten im Euglobulinlysistest kürzer sind als im PSVF. Diese Verkürzung ist in Ansätzen, denen ACS zugesetzt ist, besonders deutlich.

Drückt man den Hemmungseffekt von Inhibitoren durch das Verhältnis aus, dass zwischen den Lysiszeiten von Leerwert und inhibitorenhaltigen Ansatz besteht, so ergeben sich für die Beispiele aus Tabelle 35 folgende Werte. Für 100 γ ACS lagen die Verhältniszahlen im PSVF zwischen 1:670 und 1:1950 und im Euglobulinlysistest zwischen 1:8,4 und 1:32. Für den Organinhibitor (12,5 K.I.Einh.) zwischen 1:384 und 1:1250 im PSVF und zwischen 1:130 und 1:4400 im Euglobulinlysistest.

Trotz der Streubreite dieser Ergebnisse lässt sich zweierlei erkennen.

1) Im PSVF schwanken die Hemmungseffekte für beide Inhibitoren innerhalb etwa gleicher Grenzen, während im Euglobulinlysistest ACS viel schwächer wirkt als der Organinhibitor.

2) Im Euglobulinlysistest macht das Verhältnis für die relativ stärkste ACS-Wirkung mit 1: 32 nur den etwa zwanzigsten Teil der geringsten ACS-Wirkung im PSVF (Hemmungseffekt = 1:670) aus.

Da im PSVF, wie in vorangegangenen Versuchen festgestellt wurde, schon der vierte Teil der ACS-Menge (= 25 γ) im Ansatz ausreicht, um Lysiszeiten von 1 - 2 Minuten auf über 36 Stunden zu verlängern, so ergibt sich, daß ACS im PSVF etwa 80 mal stärker wirksam ist als im Euglobulinlysistest. Die geringe ACS-Wirkung im Euglobulinlysistest ist konstant nachweisbar und zwar unabhängig von der Art (Plasmin; Streptokinase) und Konzentration des Proteolytikums.

Tabelle 36 zeigt im serum- und thrombinfreien Euglobulinlysistest die Inhibitorenwirkung von 100 γ ACS und 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor unter steigenden Proteolytikum-ansatz-Konzentrationen.
Teil A für Streptokinase
Teil B für Plasmin.

Tabelle 36 Teil A für steigende SK-Konzentrationen.

SK-Einh. Ans.	Lysiszeit in Minuten aus Ansätzen		
	ohne Inhibitor	mit 100 γ ACS	mit 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor
-	44,0	13h-24h	30 h - 38 h
1,56	4,7	57	30 h - 38 h
3,12	2,8	34,8	30 h - 38 h
6,25	1,0	19,3	23 h - 30 h
12,5	0,9	13,8	23 h - 30 h
25,	0,5	4,5	2 h - 12 h

Tabelle 36 Teil B für steigende Plasminkonzentrationen

Plasmin γ/Ans.	Lysiszeit in Minuten aus Ansätzen		
	ohne Inhibitor	mit 100 γ ACS	mit 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor
-	6 h - 18 h	gr 60 h	gr 60 h
1,95	9,3		
3,91	6,8	25 h - 46 h	gr 60 h
7,81	4,0	5 h - 17 h	gr 60 h
15,62	2,6	92,5	gr 60 h
31,25	1,4	35,0	gr 60 h
62,5	1,0	18,5	25 h - 46 h
125,	0,7	13,0	17,5 h fl
250,	0,5	7,1	17,5 h fl

Die Ergebnisse der Tabellen 15, 19, 35, 36 sprechen dafür, dass bei der Herstellung von gereinigten Fibrinogen oder von Euglobulinniederschlägen Plasmaeigenschaften verloren gehen, die den besseren Effekt von ACS im PSVF-Ansatz bewirken.
Ist diese Annahme richtig, so müßte sich durch Zusatz dieser Plasma-Komponente zum FTF oder Euglobulinlysistest die ACS-Wirksamkeit in diesen Testen steigern lassen.
In den folgenden Versuchen wurde dieser Plasmafaktor in Form von Serum den Testen zugesetzt. Die Verwendung von Plasma schien ungeeignet, da durch dessen Fibrinogengehalt die aufzulösende Fibrinmenge des Ansatzes vermehrt, und somit die Lysisdauer verlängert wird. Die Unterscheidung, ob eine Lysiszeitverlängerung durch die erhöhte Fibrinmenge oder eine Steigerung der ACS-Wirksamkeit bedingt ist, wäre schwer zu treffen.

In den Versuchen wurde der Euglobulinlysistest in folgender Ausführung angewandt.

+ 0,05 ccm $CaCl_2$ 1,29 %

(Bei Verwendung von Thrombin im Ansatz wurde

0,01 ccm $CaCl_2$-Lösung durch Thrombinlösung 200 NIH-Einh./ccm ersetzt und als letzte Komponenten dem Ansatz zugegeben).

+ 0,05 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Inhibitor,gelöst in phys. Kochsalzlsg.

+ 0,10 ccm phys. Kochsalzlsg. oder Serum

+ 0,05 ccm SK-Lösung 125 SK-Einh./ccm

0,10 ccm Euglobulinpufferlsg.
(enthält den Euglobulinniederschlag aus 0,10 ccm Citratplasma).

Im folgenden wird gezeigt, dass unter Serum-zusatz tatsächlich eine Steigerung der ACS-Wirkung auftritt und dass diese Wirkungssteigerung für ACS,nicht aber für die Organinhibitoren nachweisbar ist.

A) Nachweis zunehmender Fibrinolysehemmung in ACS-haltigen Ansätzen (Euglobulinlysistest) bei steigenden Serumzusatz.

Tabelle 37 zeigt im thrombinfreien Euglobulinlysistest in Versuchsreihen mit und ohne ACS-Zusatz die typischen Lysiszeitveränderungen bei steigenden Serummengen im Ansatz.

Serum 1:1 ccm/Ans.	Ansatz ohne Inhibitor		Ansatz mit 100 γ ACS	
	Ger-Zeit sec.	Lys-Zeit Min.	Ger-Zeit sec.	Lys-Zeit Min.
-	158,7	0,8	135,8	8,8
0,02	81,8	1,2	81,7	12,1
0,04	63,8	1,0	64,4	19,5
0,06	62,7	1,1	61,0	17 h fl
0,08	54,4	1,2	43,2	24 h fl
0,10	48,4	1,2	48,2	gr 70 h

Man erkennt die Beschleunigung der Gerinnungsvorgänge unter steigendem Serumzusatz. Die Lysiszeiten verändern sich in den inhibitoren-freien Ansätzen geringfügig, während in ACS-haltigen Ansätzen eine deutliche Verlängerung eintritt. Dieses Ergebnis wird in Tabelle 38 und in Abbildung 14 bestätigt.

Tabelle 38 zeigt die Lysiszeiten ACS haltiger Ansätze mit und ohne Zusatz von 0,10 ccm Serum 1:1.
Tast: Euglobulinlysistest mit und ohne Thrombin.
(Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Minuten.)

Euglobulinlysistest mit 100 γ ACS/Ans. ausgeführt:			
Ohne Thrombinzusatz		Mit 2 NIH-Einh.Thrombin i.Ans.	
Ohne Serum	Mit Serum 0,10 ccm/Ans.	Ohne Serum	Mit Serum 0,10 ccm/Ans.
8,0	gr 40 h	6,5	19,6
7,8	gr 40 h	4,2	39,0
5,1	gr 60 h	6,2	25,2
5,1	gr 60 h	6,5	19,8
5,3	gr 60 h	4,9	13,9
4,7	gr 60 h	5,2	14,9
49,5	gr 35 h	4,7	12,4
7,6	gr 60 h	6,5	19,6
8,8	gr 70 h	6,4	20,0
6,8	gr 70 h	6,6	14,7
2,2	gr 37 h	6,3	15,8
2,1	gr 37 h	5,5	16,7
1,7	gr 37 h	4,9	15,7
1,5	gr 37 h	4,2	13,9

Der Effekt von Serum auf die Lysiszeiten ACS-haltiger Ansätze (mit und ohne Thrombin) ist deutlich. In Ansätzen mit Thrombinzusatz ist die Lysiszeitzunahme geringer,

wofür Verunreinigungen der Thrombinpräparate und die kürzeren Gerinnungszeiten in diesen Versuchen verantwortlich sein könnten.

Dieser Serumeffekt ließ sich auch thrombelastographisch im Rinderfibrinogen-Thrombin-Gerinnsel bei Verwendung von Plasmin und Streptokinase bestätigen.

In Abbildung 14 ist zu erkennen:

1) Die unterschiedliche Wirksamkeit von 100 γ ACS und 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor; siehe Figuren 1, 2, 3.
2) Die Amplitudenabnahme nach Serumzusatz. Figuren 1a und 2a gegenüber den Figuren 1 + 2.
3) Lysiszeitveränderungen nach Serumzusatz, wobei in inhibitorenfreien Ansätzen die Auflösung beschleunigt (Fig. 1a zu 1), im ACS-haltigen Ansatz dagegen verzögert ist (Fig. 2a zu 2).

Drückt man die Hemmwirkung von 100 γ ACS im serumfreien (Fig. 1 + 2) und im serumhaltigen Ansatz (Fig. 1a + 2a) durch das Verhältnis der Lysiszeiten K(Lys.tot.) aus, so ist dieses zwischen Fig. 1 :2 mit 1:1,47 kleiner als zwischen Fig. 1a:2a mit 1:3,38.

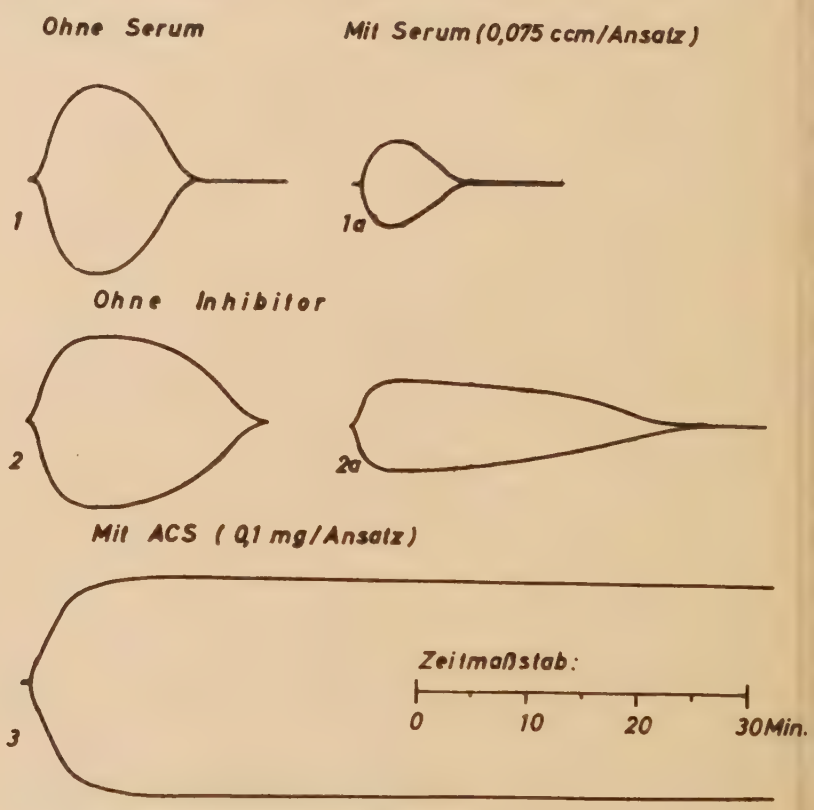
Das Ansteigen der Verhältniszahlen beweist den gesteigerten ACS-Effekt nach Serumzusatz im TEG-Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel.

Aus den bisherigen Versuchen geht hervor, dass die gute ACS-Wirkung im PSVF an das Vorhandensein eines Plasma-Faktors gebunden ist. Welche Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus von ACS ermöglichen nun diese Ergebnisse? Es sind zwei Möglichkeiten der gegenseitigen Beeinflussung von Plasma-Faktor und ACS denkbar.

Abb. 14 TEG-Pausen

A) Fibrinolyse-Hemmung durch ACS und Organinhibitor im Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel mit 0,25 mg Plasmin/Ansatz: Fig. 1, 2, 3.

B) Veränderungen des Fibrinolyseablaufes durch 0,075 ccm Serum in Ansätzen mit und ohne ACS: Fig. 1, 1a und 2, 2a.



Ansatz in Reihenfolge der Zugabe:

0,10 ccm	Barbitursäure-Puffer pH 7,6 oder Serum
0,015 ccm	0,9% NaCl-Lsg.
0,05 ccm	Inhibitor- oder 0,9% NaCl-Lsg.
0,05 ccm	Plasmin 500 mg% = 0,25 mg/Ansatz
0,20 ccm	Rinderfibrinogen-Lsg 1,5%
0,025 ccm	Thrombin-Lsg. (60 NIH-Einh./ccm)

1) ACS und der Plasma-Faktor hemmen unabhängig voneinander die Fibrinolyse. Die jeweiligen Hemmungsmechanismen beeinflussen sich nicht gegenseitig. Es summieren sich lediglich die beiden Hemmungseffekte.

2) ACS und der Plasma-Faktor beeinflussen ihre Wirkungsmechanismen gegenseitig, z. B. ACS greift aktivierend in ein plasmaeigenes Inhibitorensystem ein.

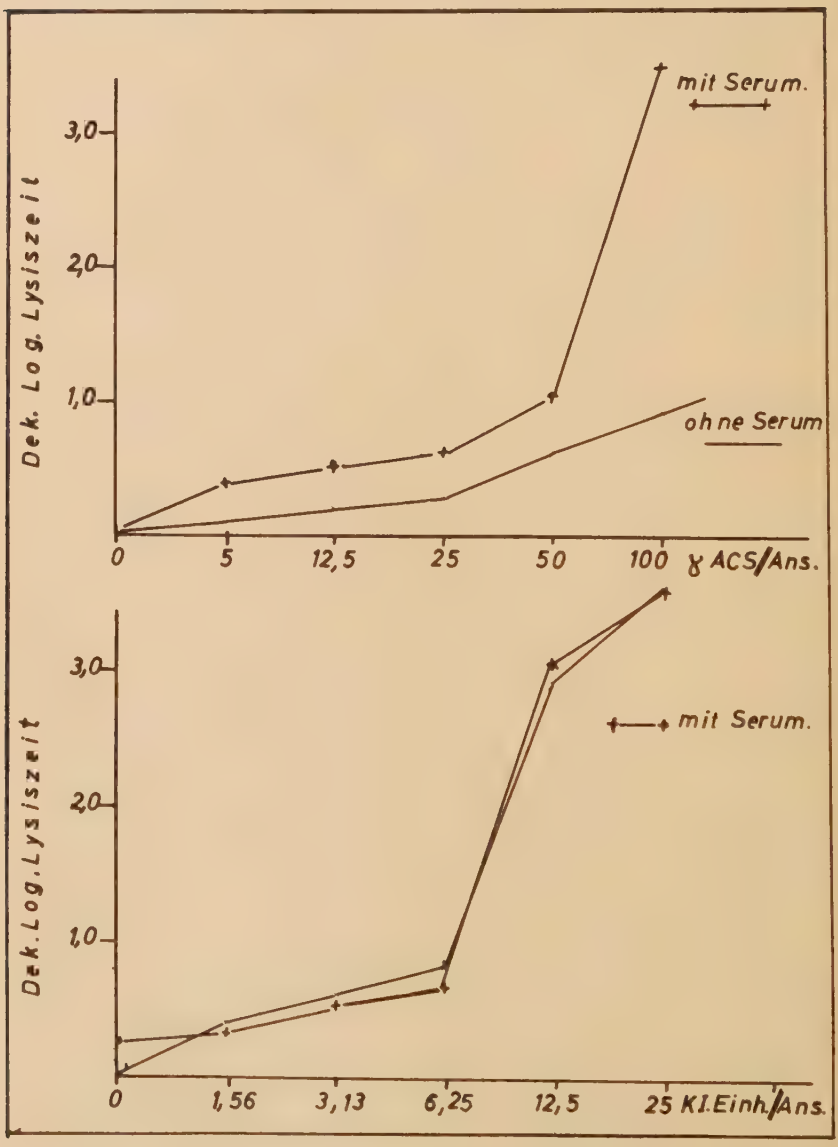
In den folgenden Versuchen soll durch weitgehende Ausschaltung der ersten dieser Möglichkeiten die zweite für die Erklärung des Wirkungsmechanismus von ACS wahrscheinlich gemacht werden.

Nimmt man an, dass ACS und der Plasma-Faktor völlig unabhängig voneinander die Fibrinolyse hemmen, so müßte die Wirkung des Plasma-Faktors auch dann feststellbar sein, wenn ACS durch andere Inhibitoren, z. B. Organinhibitoren, ersetzt wird. Dieses aber ist nicht der Fall, wie aus den folgenden Ergebnissen hervorgeht.

Abbildung 15 zeigt zwei Diagramme, deren Abszissen steigende Inhibitoren—Ansatzkonzentrationen darstellen (Fig. 1 für ACS; Fig. 2 für Organinhibitor) und auf deren Ordinaten der dek. Logarithmus der Lysiszeiten (in Min.) aufgetragen ist. Eingezeichnet sind je zwei Kurven, die die Lysiszeitveränderungen im thrombinfreien Euglobulinlysisansatz unter steigenden Inhibitorenkonzentrationen darstellen, wobei Ansatzreihen mit und ohne Serumzusatz ausgeführt wurden. Alle in den beiden Diagrammen verwendeten Werte entstammen dem gleichen Versuch. Die eingezeichneten Kurvenpunkte stellen den Mittelwert jeweils zweier Parallelbestimmungen dar.
Der Kurvenverlauf zeigt den unterschiedlichen Einfluss von Serumzusätzen auf die Inhibitorenwirkung deutlich. Während bei Verwendung steigender Organinhibitorenzusätze

Abb. 15

Wirkung von ACS und Organinhibitor (Trasylol) im thrombinfreien Euglobulinlysistest mit und ohne Serumzusatz (0,10 ccm)



die Kurven für Ansatzreihen mit und ohne Serum fast zusammenfallen, besteht bei Zugabe von ACS als Inhibitor eine deutliche Differenz zwischen den beiden Kurven.

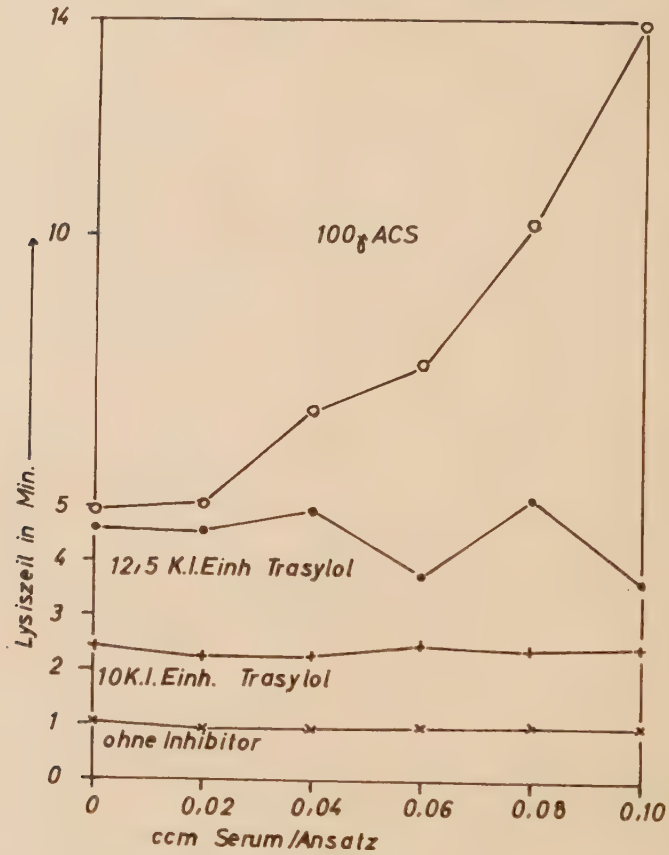
Prinzipiell das gleiche Ergebnis zeigt Abbildung 16. Hier sind aufgezeichnet die Lysiszeitveränderungen unter steigenden Serumkonzentrationen (Abszisse), gewonnen im thrombinhaltigen Euglobulinlysistest, in Versuchsreihen mit und ohne Zusatz der Inhibitoren (ACS und Organinhibitor (Trasylol). Ein Ansteigen der Lysiszeiten unter Serumzusatz ist nur in ACS-haltigen Ansätzen zu beobachten.

Durch diese Ergebnisse ist der Beweis erbracht, dass sich die Wirkungsmechanismen von ACS und dem Plasma-Faktor gegenseitig beeinflussen. Es muß somit angenommen werden, dass ACS weniger eine direkte Inhibitorenwirkung besitzt, sondern vielmehr einen Aktivator eines plasmaeigenen Inhibitorensystems darstellt.

Ob ACS neben dieser indirekten auch eine direkte Inhibitorenwirkung zukommt, ist zu erörtern. Die verschiedenen Veröffentlichungen (Lit. 10; 11; 27) und der Nachweis einer gewissen ACS-Wirkung im FTF und im Euglobulin-Lysistest scheinen dafür zu sprechen. Im PSVF und im Tierversuch dürfte die ACS-Wirkung zum größten Teil eine indirekte sein.

Konnte in den vorliegenden Versuchen nachgewiesen werden, dass ACS als Aktivator eines Plasma-Faktors wirksam ist, so zeigen die folgenden Tabellen die Thermostabilität dieses Faktors. Es wurde dem Euglobulinlysistest, (ausgeführt mit 100 γ ACS und 6,25 SK-Einh./Ans.) unterschiedlich behandeltes Serum in Mengen von 0,10 ccm zugesetzt. Solange der Plasma-Faktor durch die Erhitzung nicht inaktiviert ist, lässt sich sein Einfluß auf die Lysiszeiten feststellen.

Abb. 16 Lysiszeiten im Euglobulintest bei steigender Serumkonzentr



Ansatz in Reihenfolge der Zugabe

o,o4 ccm $CaCl_2$-Lösung 1,29 %
o,o5 ccm Inhibitoren-oder phys.Kochsalzlösung
o,1o ccm phys.Kochsalzlösung oder Serum (1:1-Plasma-$CaCl_2$ m/4o)
o,o5 ccm SK-Lösung 125 Einh./ccm (Varidase)
o,1o ccm Euglobulin-Pufferlösung PH 7,6
enthält den Euglobulinniederschlag von o,1o ccm Citratplasma
o,o1 ccm Thrombinlösung 2oo NIH-Einh./ccm (Topostasin)

Tabelle 39 zeigt Lysiszeitveränderungen unter steigenden ACS-Konzentrationen im thrombinfreien Euglobulinlysisansatz in Ansatzreihen ohne Serum; mit unbehandelten Serum; und mit Serum , 120 Minuten auf 60° C.
(Die Zahlen bedeuten Lysiszeiten von Minuten.)

ACS-Konz. γ/Ans.	Euglobulinlysisansatz (6,25 SK-Einh./Ans.)mit		
	phys. NaCl 0,10 ccm	Serum 1 : 1 unbehandelt 0,10 ccm	Serum 1 : 1 120 Min. b. 60° 0,10 ccm
- (o.SK)	9,1 10,5	gr 60 h gr 60 h	gr 60 h gr 60 h
- (m.SK)	1,0 1,6	1,3 1,3	1,5 1,8
5	1,1 1,0	2,8 3,0	3,5 3,3
12,5	1,0 1,2	3,9 4,4	4,7 4,2
25,	1,6 1,7	5,6 6,5	6,8 7,8
50,	2,7 3,0	18,2 20,	15,3 17,1
100,	5,1 5,1	gr 60 h gr 60 h	gr 60 h gr 60 h

Man erkennt in den 3 Versuchsreihen den Einfluß steigender ACS-Wirkungen auf die Lysiszeiten. Dabei liegen die Lysiszeiten des serumfreien Ansatzes unter denen nach Serumzusatz. Zwischen den Ansatzreihen nach Zusatz von behandelten und unbehandelten Serum sind keine signifikanten Lysiszeitenunterschiede erkennbar.

Hieraus wird geschlossen, dass der Plasma-Faktor durch Erhitzung auf 60° C über 120 Minuten nicht wesentlich inaktiviert wird. Wurde das Serum höher erhitzt, so ging die Wirkung des Plasma-Faktors verloren.

Tabelle 40 zeigt den Einfluss verschieden behandelter Seren und sonstiger Zusätze auf die ACS-Wirksamkeit im thrombinhaltigen Euglobulinlysistest, ausgeführt mit 2 NIH-Einh. Thrombin, 100 γ ACS und 6,25 SK-Einh. im Ansatz. (Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Minuten.)

Leerwert NaCl 0,9% 0,10 ccm	Ansatz mit Zusätzen 0,10 ccm	Art der Zusätze
6,5 6,6 6,5	14,7 15,8 15,7	Serum 1:1 (1 Teil Citratplasma 1:5 + 1 Teil m/40 $CaCl_2$)
	gr 60 h gr 60 h	Schüttelblut: 2 h b. 37° C
	13,8 17,4	Serum: Bariumsulfat ads. 2 ccm Serum + 100 mg $BaSO_4$
	13,4 12,7 11,7 10,9 10,2 9,4	Serum: erhitzt b. 75° C a) 15 Min. b) 30 Min. c) 100 Min.
	7,4 7,0	Tyrode I
7,3	6,8	Gereinigtes Human-Albumin 4 g %
4,2 4,8 5,5	13,9 14,5 15,7	Serum 1:1
	9,1 8,6 7,8 7,5 5,0 4,3	Serum: erhitzt b. 85° C a) 15 Min. b) 30 Min. c) 120 Min. (Abzentrif.)
	4,9 4,9	Serum: 5 Min. gekocht. Abzentrif. d. Nieders.

In Tabelle 40 ist der Effekt von Schüttelblut gegenüber dem verdünnten Serum (1:1) bedeutend stärker. Durch Bariumsulfat wird die Serumeigenschaft nicht aufgehoben. Der Wirkungsabfall des Plasma-Faktors nimmt mit steigender Temperatur zu. Es reichen bei 85° C 120 Min., bei 100° C 5 Min. aus, um den Plasma-Faktor zu inaktivieren.

Untersuchungen in vivo

I. Zur Durchführung der Tierversuche (Kaninchen)

Nachgewiesen wurden Veränderungen der Fibrinolysevorgänge in vivo nach Injektion von Proteolytikum oder Inhibitoren (ACS; Organinhibitoren) im Thrombelastogramm (ausgeführt mit Nativblut), im Misch-PSVF und im Hasen-PSVF. Vor, sogleich nach und in wachsenden Zeitabständen nach intravenöser Injektion der auszutestenden Substanz (Proteolytikum, Inhibitoren) wurden aus der Ohrvene Blutproben entnommen und zwar zur Citratblutherstellung (0,3 ccm Natriumcitrat 3,8 % + 1,2 ccm Nativblut) und für das Nativblutthrombelastogramm.

A) Zeitliche Versuchsdurchführung.

Die Entnahme der einzelnen Blutproben wurde in ihrer zeitlichen Zuordnung zum Versuchsverlauf registriert. Es wurde jeweils der Abschluss der Blutentnahme (gemeinsam für Citratblut und TEG) notiert. Als Versuchsbeginn wurde der Abschluss der Blutentnahme für den Leerwert festgelegt. Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Injektionen wurden so kurz wie möglich gehalten (1-3 Minuten), ebenso das Intervall zwischen Leerwert und Beginn der ersten Injektion. In Versuchen allerdings, in denen nach der letzten Injektion weitere TEG-Kontrollen ausgeführt werden sollten, mußte aus technischen Gründen-(da sich im Thrombelastographen nur drei Schreibungen nebeneinander ausführen lassen)-der Leerwert etwa eine Stunde vor Beginn der ersten Injektion bestimmt werden.

B) Behandlung der entnommenen Blutproben

Die für das TEG-bestimmten Nativblutproben wurden sofort nach ihrer Entnahme in den Thrombelastographen eingesetzt. Das Citratblut wurde in Zentrifugengläsern, nach gutem Durchmischen, bis zur weiteren Verwendung im Eis-Wasser-Bad aufbewahrt, dann 5 Minuten bei 1000 Umd./Min. abzentrifugiert und in den folgenden Testen verwandt.

a) Misch-PSVF, der nebeneinander menschliches und tierisches Plasma enthält.

0,05 ccm $CaCl_2$-Lösung 1,29 %
+ 0,06 ccm Human-serum 1:1
+ 0,05 ccm Streptokinaselösungen verschiedener Konzentrationen
+ 0,10 ccm Human-plasma 1:5
+ 0,10 ccm Tier-plasma 1:5

Dabei wurden Calciumlösung und Serum im Uhlenhuthröhrchen (37° C) vorgelegt und die übrigen Ansatzkomponenten in schneller Reihenfolge zugegeben. Mit der Bestimmung der Gerinnungszeit wurde nach dem Zusatz von Human-plasma begonnen.

b) Tier-PSVF (frei von menschlichen Plasma oder Serum)

0,04 ccm $CaCl_2$-Lösung 1,29 %
+ 0,10 ccm tierisches Serum 1:1
+ 0,12 ccm phys. Kochsalzlösung oder Zusätze (meist Proteolytikum), gelöst in phys. Kochsalzlsg.
+ 0,10 ccm tierisches Plasma 1:5.

C) Aussagevermögen der einzelnen Methoden

Veränderungen der Fibrinolyse in vivo nach Injektion von Inhibitoren und Proteolytika wurden im TEG-Nativblut und in den obenbeschriebenen Testen in vitro festgestellt.

Dabei ist das TEG, ausgeführt mit Nativblut, allein geeignet, Aussagen über die Ausmaße der Veränderungen zu machen. Die Ergebnisse in den übrigen Methoden können lediglich Hinweise auf die prinzipiellen Vorgänge in vivo geben, da je nach Verdünnung, Aufbewahrungsdauer und Art der Zusätze die im Nativblut vorliegenden Verhältnisse verändert werden, auch wenn dies für alle innerhalb eines Versuches gewonnenen Citratplasmen in gleichem Umfange geschieht.

Den Untersuchungen im Misch- und Tier-PSVF liegt die Annahme zu Grunde, dass nach intravenöser Injektion einer Substanz (Proteolytikum oder Inhibitoren) diese in der Blutbahn und damit in den abgenommenen Blutproben vorhanden ist und in einem Standardgerinnsel eine Beschleunigung bzw. Verzögerung der Fibrinolyse bewirkt. Wird beispielsweise im Misch-PSVF, der mit X SK-Einh./Ans. ausgeführt wird, nach Zusatz von Plasma 1 (gewonnen aus dem Citratblut vor der Injektion) eine Lysiszeit von 6 Min. gestoppt, so ergibt sich nach Zusatz von Plasma 2 (gewonnen nach der Injektion) je nachdem, ob dieses wirksame Inhibitoren- oder Proteolytikumsmengen enthält, eine Verlängerung bzw. Verkürzung der Lysiszeiten.

II. Proteolytika und Inhibitoren in vivo

A) Verträglichkeit der Substanzen.

Bei allen Hasen (3,6 - 5,2 kg) wurden Dosen von 10 - 16 000 SK-Einheiten (Varidase), ebenso Mengen von 200mg ACS oder 10 - 15 000 K.I.Einh. Organinhibitor (in einem Fall sogar 33 000 K.I.Einh. Lungeninhibitor) gut vertragen. Die Tiere zeigten trotz des relativ hohen Blutverlustes (bis 13 ccm) keine anhaltenden Verhaltensänderungen. Jedes Tier wurde nur einmal verwendet, da

nach dem Versuch mit Anaemie und Sensibilisierung gegenüber den injizierten Substanzen gerechnet werden mußte.

B) Nachweis fibrinolyseunabhängiger Veränderungen von TEG-Größen.

In den Thrombelastogrammen, durchgeführt mit Nativblut, konnte im Verlauf der Versuche verschiedentlich, wenn auch nicht konstant, eine Verkürzung der Reaktionszeiten nach der ersten Injektion gesehen werden.

Tabelle 41 zeigt die Verkürzung der Reaktionszeiten im TEG-(Nativblut) nach intravenöser Injektion von Proteolytikums- oder Inhibitorenlösung beim Kaninchen.

Reaktionszeit in Minuten		Injizierte Substanz.
R_1 (Vor Injektion)	R_2 (Nach Injektion)	
7,8	1,3	10 000 SK-Einh.
11,3	1,0	10 000 SK-Einh.
12,5	5,0	16 000 SK-Einh.
2,8	3,0	16 000 SK-Einh.
16,5	0,8	16 000 SK-Einh.
7,0	3,0	200 mg ACS
11,5	0,8	3 200 K.I.Einh. Lungeninhibitor
12,5	2,5	33 000 K.I.Einh. Lungeninhibitor
6,0	8,3	10 000 K.I.Einh. Trasylol
8,5	1,8	6 000 K.I.Einh. Trasylol + 100 mg ACS

Die in Tabelle 41 gezeigte Beschleunigung der Spontangerinnung nach Injektion von Proteolytikum- oder Inhibitorenlösung war nicht konstant nachweisbar. Bei Verwendung von Citratplasma in den übrigen Testen (Misch-PSVF oder Tier-PSVF) ließen sich Veränderungen der Gerinnungszeiten nicht erkennen. Da in vitro eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung, zumindest von ACS und den Proteolytika, nicht festgestellt werden konnte (s. Tab. 8 und 9) so scheint es sich, - auch wenn Spontangerinnung und Recalcifizierung nicht ohne weiteres vergleichbar sind - bei der beobachteten Hyperkoagulabilität entweder um Artefakte oder um eine unspezifische Reizbeantwortung von seiten des Tieres zu handeln.

Als weitere fibrinolyseunabhängige Veränderung am TEG wurde eine Zunahme der von den TEG-schenkeln umschlossenen Flächen nach intravenöser Inhibitoreninjektion beobachtet. In der folgenden Tabelle sind die Flächen von TEG-(Nativblut)-ableitungen vor und nach Inhibitoreninjektion aufgeführt. Die planimetrische Bestimmung erstreckte sich für F_1 und F_2 über gleiche Registrationsdauer nach abgeschlossenen Reaktionszeiten.

Eine deutliche Zunahme der Flächen F_2 und der max. Amplituden a_2 gegenüber den Leerwerten ist nach der Inhibitoreninjektion erkennbar. Durchschnittlich liegen die Werte für F_2 um 66 %, für a_2 um 25 % über den zugehörigen Leerwerten F_1 und a_1.

Tabelle 42 zeigt Veränderungen der Flächen und max. Amplituden in Thrombelastogrammen (Nativblut) nach intravenöser Injektion von Inhibitorenlösungen.

Inhibitor	Flächenbestimmung ü. Regist. Dauer in Min.	Fläche cm^2		max.Amplit.mm	
		F_1 v. Inj.	F_2 n. Inj.	a_1 v. Inj.	a_2 n. Inj.
ACS 200 mg	25	16,4	24,5	52	64
Lung.3200 E.	30	19,5	33,1	54	67
Lung.33000 E.	37,5	22,7	38,6	53	66
Trasyl.10000E.	24	13	13,1	45	43
ACS 100 + Trasyl.6000 E.	15	3,7	8,9	32	48

Obwohl verschiedentlich am TEG-Fibrinogen-Thrombin-Gerinnsel nach Zusatz von Organinhibitoren, nicht dagegen von ACS, ähnliche Veränderungen gesehen wurden, lässt sich bei der geringen Anzahl der vorliegenden Versuche kaum entscheiden, ob diese Zunahme der TEG-Flächen und der Amplituden als Artefakte, als spezifische Organinhibitorenwirkung oder als unspezifische Reizbeantwortung des Versuchstieres, aufzufassen ist. Das Ausmaß der Veränderungen scheint im Sinne einer spezifischen Organinhibitorenwirkung zu sprechen.

C) Nachweis der Wirksamkeit von Proteolytikum (Streptokinase) und Fibrinolyse-inhibitoren (ACS und Organinhibitoren)

1) Streptokinase (Varidase) als wirksames Proteolytikum in vivo (Kaninchen)

Es wurden 10 - 16 000 SK-Einheiten (Varidase) pro Tier injiziert (Injektionsdauer etwa 1 Minute). Die dadurch

hervorgerufene Hyperfibrinolyse im (Nativblut)-TEG soll in Tabelle 43 an Hand eines Flächenvergleiches der TEG-Figuren vor und nach SK-Injektion gezeigt werden. In Spalte 5 sind außerdem die Werte für $K_{(Lys.tot.)}$ nach SK-Injektion aufgeführt. In den zugehörigen Leerwerten (= vor SK-Inj.) waren erwartungsgemäß innerhalb der Registrationsdauer keinerlei Anzeichen einer Fibrinolyse zu beobachten, und damit die Werte für $K_{(Lys.tot.)}$ nicht bestimmbar.

Tabelle 43 zeigt fibrinolysebedingte Flächenverkleinerung im (Nativblut)-TEG nach intravenöser Streptokinase-Injektion am Kaninchen.

Inj. von SK-Einh.	Flächenbestimmung ü. Regist. Dauer in Min.	Fläche cm^2		$K_{(Lys.tot.)}$ Min. nach Inj.
		F_1 vor Inj.	F_2 nach Inj.	
10 000	125	121,5	0,1	2,5
10 000	155	123,5	0,2	2,8
16 000	84	102,9	0,1	3,0
16 000	34	34,1	kl 0,1	4,0
16 000	30	17,4	1,0	12,5
16 000	25	20,7	0,1	5,5
16 000	25	14,5	0,1	3,0
16 000	22,5	18,5	0,1	3,0
16 000	22,5	13,7	kl 0,1	9,5
16 000	19	12,1	kl 0,1	3,5

Die fibrinolysebedingte Flächenverkleinerung nach Streptokinaseinjektion ist deutlich. Die Flächen F_2 schwanken zwischen 0,1 bis 0,2 cm^2. Die Form solcher schnelllysiger TEG-Kurven ist aus Fig. 2 in Abb. 19, 20, 21 zu ersehen.

Auch im Misch-PSVF und Tier-PSVF lässt sich die Fibrinolysebeschleunigung nach SK-Injektion nachweisen. In Tabelle 44 sind aus Hasenversuchen die Lysiszeiten gegenübergestellt, die in den beiden Testen bei Verwendung von Citratplasmen, gewonnen vor (P_1) und nach der SK-Injektion (P_2), gemessen wurden.

Tabelle 44 zeigt Lysiszeitverkürzung im Misch- und Hasen-PSVF bei Verwendung von Hasencitratplasma, gewonnen nach intravenöser SK-Injektion.
(Die unter den beiden Testen angeführten Werte entstammen jeweils verschiedenen Tierversuchen.)

Misch-PSVF			Hasen-PSVF		
SK-Zusatz Einh.	Lysiszeit Min. bei Plasmazusatz		SK-Zusatz Einh.	Lysiszeit Min. bei Plasmazusatz	
	P_1 (v. Inj.)	P_2 (n. Inj.)		P_1 (v. Inh.)	P_2 (n. Inj.)
200	1,6	2,6	12,5	4,2	3,5
37,5	1,8	1,5	12,5	5,3	2,9
6,25	3,5	2,0	12,5	5,8	4,1
6,25	4,4	2,2	12,5	6,6	3,1
6,25	10,6	3,9	-	gr 36 h	3,0
6,25	24,7	4,5	-	gr 36 h	gr 36 h
6,25	71,0	3,9	-	gr 36 h	gr 36 h
-	gr 36 h	3,0			

In beiden Testen sind die Auflösungszeiten unter P_2 gegenüber P_1 verkürzt.
Die Lysiszeiten bei Verwendung von P_1 im Ansatz sind allein abhängig von der SK-Menge, die dem Misch- oder Tier-PSVF zugesetzt wird. Bei Zugabe von P_2 zum Ansatz hat das in diesem Plasma enthaltene Proteolytikum einen zusätzlichen Einfluss auf die Lysisintensität.

Da die Empfindlichkeit auf Streptokinase von Versuch zu Versuch erheblich schwankt, wie aus Tabelle 44 im Misch-PSVF nach Zusatz von jeweils 6,25 SK-Einh./Ans. unter P_1 zu erkennen ist, mußte für jeden Versuch die günstigste SK-Menge bestimmt werden. In den Versuchen wurden die Lysiszeiten in Ansätzen mit P_1 zwischen 2 - 4 Minuten gewählt, wofür SK-Mengen zwischen 12,5 bis 6,25 Einh./ Ans. nötig waren.

2) ACS und Organinhibitoren (Trasylol und Lungeninhibitor) als wirksame Fibrinolyseinhibitoren in vivo (Kaninchen)

Es wurde in schneller Folge (2 - 4 Minuten) Proteolytikum und Inhibitor nacheinander intravenös injiziert und die Veränderungen in Plasma und Nativblut vor, zwischen und nach den Injektionen registriert. Die Inhibitorenwirkung auf SK-induzierte Hyperfibrinolyse in vivo ist in der folgenden Tabelle an Hand der Flächenveränderungen von Nativblut-Thrombelastogrammen aufgezeigt. Dabei sind die Flächen F_1 für den Leerwert vor, F_2 für den Kontrollwert nach Injektion von jeweils 16 000 SK-Einheiten (Varidase) und F_3 für den Kontrollwert sofort nach Inhibitoreninjektion angegeben.

In den Versuchen 1 und 4 sind die geringen Flächenwerte (F_3) nicht fibrinolysebedingt, es zeigten sich vielmehr Abrisse und Unregelmäßigkeiten bei der Gerinnselentstehung in diesen TEG-Ableitungen.

Tabelle 45 zeigt im TEG-(Nativblut) die Wirksamkeit von intravenös applizierten Fibrinolyse-inhibitoren (ACS und Organinhibitoren) auf SK-induzierte Hyperfibrinolyse an Hand von Flächenveränderungen.

Vers. Nr.	Hasengewicht kg	Inj. Inhibitor	TEG-Flächen bestimmt ü. Min.	Fläche (cm^2) für F_1	F_2	F_3
1	4,2	100 mg ACS	84	102,9	0,1	+37,3
2	4,5	100 mg ACS	25	14,5	0,1	1,9
3	4,5	200 mg ACS	23	13,7	0,1	17,0
4	4,2	200 mg ACS	30	17,4	1,0	+ 5,2
5	4,8	10000 E.Org.Inh.	19	12,1	0,1	10,7
6	5,2	10000 E.Org.Inh.	25	20,7	0,1	14,1
7	4,0	100 mg ACS + 6000 E.Org.Inh.	34	34,1	0,1	33,6

Ebenfalls im Misch- und-Hasen PSVF ist der Inhibitor nach intravenöser Injektion gut nachweisbar.

In Tabelle 46 sind die Lysiszeiten bei Zusatz von Hasenplasma zum Misch-PSVF aufgeführt. Die Lysiszeiten bei Zusatz von Hasenplasma (gewonnen vor Inhibitoreninjektion) lassen keinen Hinweis auf die in vivo bestehende Hyperfibrinolyseintensität zu, da dem Misch-PSVF jeweils geeignete Proteolytikum-mengen zur Erreichung gut überwachbarer Lysiszeiten zugesetzt wurden.

In den Tabellen 45 und 46 sind teilweise die gleichen Versuche verwendet.

Tabelle 46 zeigt im Misch-PSVF die Wirksamkeit inhibitorenhaltiger Citratplasmen, gewonnen nach intravenöser Injektion von ACS oder Organinhibitoren am Kaninchen.

Vers. Nr.	Injizierter Inhibitor	Lysiszeit i.Min. bei Verwendung von Plasma	
		(v.Inh.Inj.)	(n.Inh.Inj.)
1	ACS 100 mg	2,2 2,6	gr 20 gr 20
2	ACS 100 mg	1,5 1,6	gr 36 h gr 36 h
3	ACS 100 mg	2,0 2,0	10,8 10,2
4	ACS 200 mg	3,6 3,6	gr 36 h gr 36 h
5	ACS 200 mg	2,1 2,2	gr 40 h gr 40 h
6	ACS 200 mg	3,6 3,7	gr 60 h gr 60 h
	Organinhibitoren K.I.Einh.		
7	10 000 E. Trasylol	10,6 9,8	24h-36h 24h-36h
8	10 000 E. Trasylol	3,0 2,6	gr 36 h gr 36 h
9	10 000 E. Trasylol	3,5 3,9	gr 36 h gr 36 h
10	33 000 E. Lungeninh.	6,7 6,5	gr 36 h gr 36 h
	Organinhibitor und ACS gemischt		
11	ACS 100 mg + 6000 E. Trasylol	6,5 5,8	gr 45 h gr 45 h
12	ACS 100 mg + 6000 E. Trasylol	2,3 2,4	gr 50 h gr 50 h

Die Zunahme der Inhibitorenwirkung nach intravenöser ACS oder Organinhibitoren-Injektion ist deutlich. Nachdem die Wirksamkeit von Proteolytikum (Streptokinase) und Fibrinolyseinhibitoren in vivo (Kaninchen) nachgewiesen werden konnte (Tab. 43 bis 46), soll im folgenden die Verweildauer der einzelnen Inhibitoren in der Blutbahn des Tieres bestimmt werden.

III. Bestimmung der Verweildauer der aktiven Inhibitoren in der Blutbahn des Versuchstieres an Kaninchen und Hund (2 Versuche).

Zu diesem Zweck wurde in einer Reihe von Tierversuchen nach Inhibitoreninjektion, (gleichgültig ob mit oder ohne vorangehender Proteolytikum-verabreichung) in zeitlich wachsenden Abständen Blutproben entnommen und diese im TEG und im Misch- und Tier-PSVF auf ihre fibrinolysehemmende Wirksamkeit untersucht.

Die hierbei für die einzelnen Versuche im Misch- und Tier-PSVF gemessenen Lysiszeiten sind in Tabelle 47 zusammengestellt. Der Tabelle sind auch die zeitlichen Beziehungen zwischen den einzelnen Blutentnahmen und dem Abschluss der Inhibitoren-Injektion zu entnehmen. Etwa verwendete Proteolytika wurden unmittelbar vor dem Inhibitor injiziert. Das Gewicht der Versuchstiere lag zwischen 3,6 und 5,2 kg.

Tabelle 47 zeigt das Verhalten der Lysiszeiten im Misch- und Tier-PSVF bei Verwendung von Citratplasmen, gewonnen vor und in wachsenden Zeitabständen nach intravenöser Inhibitoreninjektion. (Zahlen bedeuten Lysiszeiten in Min.)

Teil A: Inhibitor: ACS

Versuch Nr. 1 Injektion von 10 000 SK-Einh. + 100 mg ACS

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injekt.	
		sofort	70
Misch-PSVF mit 200 SK-Einh./Ans.			
1,3	2,2	gr 20	1,9
1,6	2,6	gr 20	1,4

Versuch Nr. 2 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 100 mg ACS

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor Injekt.		
		sofort	20	90
Misch-PSVF mit 37,5 SK-Einh./Ans.				
1,8	1,5	gr 36 h	2,3	1,7
2,5	1,6	gr 36 h	2,5	1,5

Versuch Nr. 3 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 100 mg ACS

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injekt.				
		sofort	16	32	60	90
Misch-PSVF mit 6,25 SK-Einh./Ans.						
3,5	2,0	10,7	5,5	3,5	4,4	4,1
3,2	2,0	10,2	5,8	3,8	4,8	3,7

Fortsetzung Tabelle 47 Teil A

Versuch Nr. 4 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 200 mg ACS

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion					
		sofort	8	18	37	55	75
Misch-PSVF mit 6,25 SK-Einh./Ans.							
4,4	2,1	gr 40 h	gr 40 h	14,5	8,8	9,9	9,6
4,3	2,2	gr 40 h	gr 40 h	14,1	8,5	11,9	10,2
						11,6	11,7
Misch-PSVF mit 12,5 SK-Einh./Ans.							
2,7	2,0	gr 40 h	gr 40 h	6,1	4,7		3,6
2,1	1,7	gr 40 h	gr 40 h	6,3	4,8		4,7

Versuch Nr. 5 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 200 mg ACS

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion				
		sofort	7	19	29	60
Misch-PSVF mit 6,25 SK-Einh./Ans.						
71	3,6	gr 60 h	gr 60 h	gr 60 h	150 fl	55
72	3,7	gr 60 h	gr 60 h	25 h	150 fl	
Misch-PSVF mit 12,5 SK-Einh./Ans.						
3,5	2,6	gr 60 h	gr 60 h	36	16,7	9,7
3,9	2,6	gr 60 h	gr 60 h	50	15,5	10,4

Versuch Nr. 6 Injektion von 200 mg ACS

Leerw.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion								
	sofort	3	5	7	10	15	20	30	240
Misch-PSVF mit 25 SK-Einh./Ans.									
3,6	gr 36 h	24	11,7	10,6	7,0	5,9	5,3	5,1	3,4
3,6	gr 36 h	15,7	11,3	6,7	6,4	7,2	5,8	5,3	3,6
		14,6	11,8	6,4	6,7				

Fortsetzung Tabelle 47

Teil B: Inhibitor: Organinhibitoren

Versuch Nr. 7 Injektion von 10 000 K.I.Einh. Trasylol

Leerw.	Blutentnahme: in Min. nach Inhibitor-Injektion						
	sofort	3	7,5	13,5	24,5	39	90
Misch-PSVF mit 13 SK-Einh./Ans.							
9,0	24 -36h	3-13 h	9,7	8,6	6,8	8,0	8,9
10,6	24 -36h	12-17 h	14,5	15,0	9,3	6,5	7,3
				13,5			

Versuch Nr. 8 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 10 000 + 5 000 K.I.Einh, Trasylol

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme nach Injektion von 10000 E Trasylol	15 000 E. Trasylol sofort	11 Min.	41 Min.	60 Min.
Misch-PSVF mit 6,25 SK-Einh./Ans.						
4,2	1,9	6,0	8,1	4,4	4,4	4,8
4,8	1,8	5,8	8,7	4,0	4,4	5,3
Misch-PSVF ohne SK Zusatz						
gr 36h	3,0	gr 36 h		gr 36 h		gr 36 h
gr 36h	2,6	gr 36 h		gr 36 h		gr 36 h

Versuch Nr. 9 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 10 000 K.I. Einh. Organinhibitor (Trasylol)

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injekt.				
		sofort	6	13	7,9	55
Misch-PSVF mit 6,25 SK-Einh./Ans.						
9,8	3,5	gr 36 h	6,0	6,5	7,9	11,3
10,6	3,9	gr 36 h	6,2	5,5	7,4	9,7
						10,0

Fortsetzung Tabelle 47 Teil B

Fortsetzung Versuch Nr. 9

Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion				
		sofort	6	13	26	55
Misch-PSVF mit 12,5 SK-Einh./Ans.						
2,7	2,3	13,1	2,8	2,7		
2,7	2,2	13,9	2,5	2,8		
		13,9				
		13,8				

Hundeversuch I Injektion von 50 000 K.I.Einh. Trasylol
Hundegewicht 20 kg

Leerw.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion			
	3	20	90	120
Misch-PSVF mit 10 SK-Einh./Ans.				
2,6	36 h fl	3,1	2,7	3,0
2,6	36 h fl	3,0	2,8	2,6
Misch-PSVF mit 5 SK-Einh./Ans.				
60,	gr 36 h	325 fl	100	100
55,	gr 36 h	325 fl	90	100

Fortsetzung Tabelle 47 Teil B

Hundeversuch II Injektion von 50 000 K.I.Einh. Trasylol
Hundegewicht 23 kg

Leerw.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion			
	3	15	30	60
Misch-PSVF mit 10 SK-Einh./Ans.				
1,5	150	4,3	2,2	2,1
1,4	150	4,0	2,2	1,8
Misch-PSVF mit 7 SK-Einh./Ans.				
2,7	8,5 h fl	4 h fl	8,5	5,7
2,8	8,5 h fl	4 h fl	9,6	5,0
Tier-PSVF mit 12,5 SK-Einh./Ans.				
1,1	gr 24 h	gr 24 h	3 h fl	2,5
1,2	gr 24 h	gr 24 h	3 h fl	2,3

Versuch Nr. 10 Injektion von 15 + 18 000 K.I.Einh. Lungeninhibitor

Leerw.	Blutentnahme nach Injektion von						
	15 000	33 000 K.I.Einh. Lungeninhibitor					
	K.I.E.	sofort	5 Min	15 Min	40 Min	70 Min	120 Min
Misch-PSVF mit 10 SK-Einh./Ans.							
5,0	17-34 h	gr36h	17-36 h	19,1	11,0	8,4	6,8
5,4	17-34 h	gr36h	17-36 h	22,3	6,3	10,5	7,1
6,7							
6,3							

Fortsetzung Tabelle 47

Teil C: Inhibitor: Mischung aus ACS und Organinhibitor (Trasylol)

Versuch Nr. 11 Injektion von 100 mg ACS + 6 000 K.I.Einh. Organinhibitor (Trasylol)

Leerw.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion						
	sofort	7,5	13	17	30	43	73
Misch-PSVF mit 16,6 SK-Einh./Ans.							
5,8	gr 45 h	gr 45 h	45 h fl	17 h	185	3-17 h	66
Misch-PSVF mit 25 SK-Einh./Ans.							
4,4	gr 45 h	24 h fl	150 fl	44	11	10,8	12,8
3,8	gr 45 h	24 h fl	150 fl	35	12,5	9,5	9,0
Misch-PSVF mit 50 SK-Einh./Ans.							
2,6	gr 45 h	12,9	5,8	4,7	3,6	3,2	3,3

Versuch Nr. 12 Injektion von 16 000 SK-Einh. + 100 mg + 6000 K.I.Einh. Organinhibitor (Trasylol)

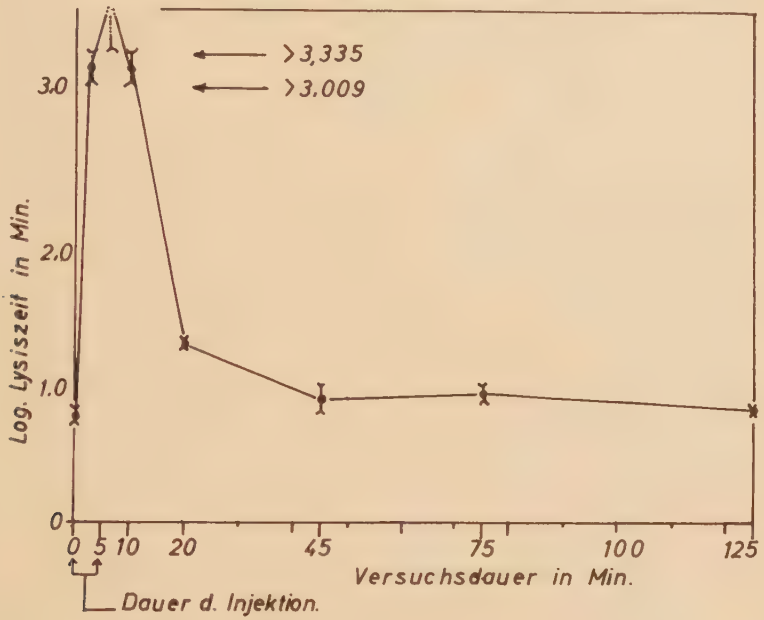
Leerw.	nach SK-Inj.	Blutentnahme: Min. nach Inhibitor-Injektion				
		sofort	7	16	31	60
Misch-PSVF mit 6,25 SK-Einh./Ans.						
5,4	2,3	gr 50 h	26 h fl	26 h fl	16 h fl	45
5,2	2,4	gr 50 h	26 h fl	26 h fl	16 h fl	46
Misch-PSVF mit 12,5 SK-Einh./Ans.						
2,1	1,7	gr 50 h	13,0	10,8	4,2	2,9
2,0	1,7	gr 50 h	11,9	9,7	3,3	2,9

In zwölf Hasen- und zwei Hundeversuchen wurden unter verschiedenem SK-Zusatz im Misch- und Tier-PSVF insgesamt 24 Lysiszeitfolgen, teils in Einzel- teils in Doppelbestimmungen gewonnen. Stellt man diese Lysiszeitfolgen in Diagrammen dar, auf deren Abszissen die Versuchsdauer, und auf deren Ordinate der dekadische Logarithmus der Lysiszeiten aufgetragen ist, so ergeben sich typische Kurvenverläufe (Abb. 17), nämlich mit einem Gipfel nach der Inhibitoreninjektion, einem steilen Abfall in Lysiszeitbereiche von etwa 10 Minuten und mit einem nahezu horizontalverlaufendem Endstück.

Der Übergang von steilem Abfall zum horizontalen Verlauf trat in 22 Fällen innerhalb einer Versuchsdauer von 6 - 30 Minuten nach der Inhibitoreninjektion auf, wobei die Lage in Bezug auf die Abszisse weitgehend von den absoluten Lysiszeiten und somit von der SK-Menge, die dem Misch- oder Tier-PSVF zugesetzt wurde, abhängig ist. Von 21 Lysiszeitfolgen, in denen die Auflösungszeit der Leerwerte unter 10 Minuten lag, waren in 18 Fällen die Lysiszeiten 40 Minuten nach vollendeter Inhibitoreninjektion in diesen Größenbereich zurückgekehrt; in drei Fällen lagen sie innerhalb der 100-Minutengrenze. Dabei waren von diesen 21 Lysiszeitfolgen die Auflösungszeiten in 15 Fällen direkt nach der Inhibitoreninjektion auf Werte über 36 Stunden gestiegen.

Der flacherverlaufende Endteil der Kurve lag in den meisten Fällen etwas über dem zugehörigen Vergleichswert vor der Inhibitoreninjektion. Es wird daraus geschlossen, dass sich nach dem starken Wirkungsabfall innerhalb der ersten 40 Minuten nach Injektion noch geringe Mengen wirksamen Inhibitors in der Blutbahn vorfinden, deren Existenz allerdings mit feineren Methoden nachgewiesen werden müßte.

Abb.17 *Schneller Abfall der Inhibitorenwirkung nach einmaliger Injektion im Tierversuch: Typischer Lysiszeitverlauf im Misch-PSVF. (Lungeninhibitor, 33 000 K.I.-Einh.; Kaninchen, 5,6 Kg).*



Durchführung

Vor,während und nach der Inhibitoreninjektion wurden dem Versuchstier Citratblutproben entnommen (1,2 ccm Nativblut + o,3 ccm 3,8 % Natrium-Citratlösung)

Ansatz in Reihenfolge der Zugabe.

o,o2 ccm phys. Kochsalzlösung
o,o4 ccm $CaCl_2$ 1,29 %
o,1o ccm Humanserum (1:1 Plasma -$CaCl_2$ m/4o)
o,o5 ccm SK-Lösung 2oo Einh./ccm (Bistreptase)
o,1o ccm Human-citrat-plasma 1:5

Nach dieser Zugabe wurde mit der Gerinnungszeitbestimmung begonnen. Sofort anschließend Zugabe von

o,o5 ccm Kaninchen-citrat-plasma 1:5

Als Ergebnis der Tabelle 47 ist hervorzuheben der nahezu völlige Wirkungsverlust innerhalb 40 Minuten nach der Inhibitoreninjektion, gleichgültig ob ACS,Organinhibitoren oder eine Mischung dieser Substanzen Verwendung fand.

Dieses in der Hauptsache am Kaninchen gewonnene Resultat ließ sich, wenigstens für Organinhibitoren, auch im Hundeversuch bestätigen. (s. Abb. 18)

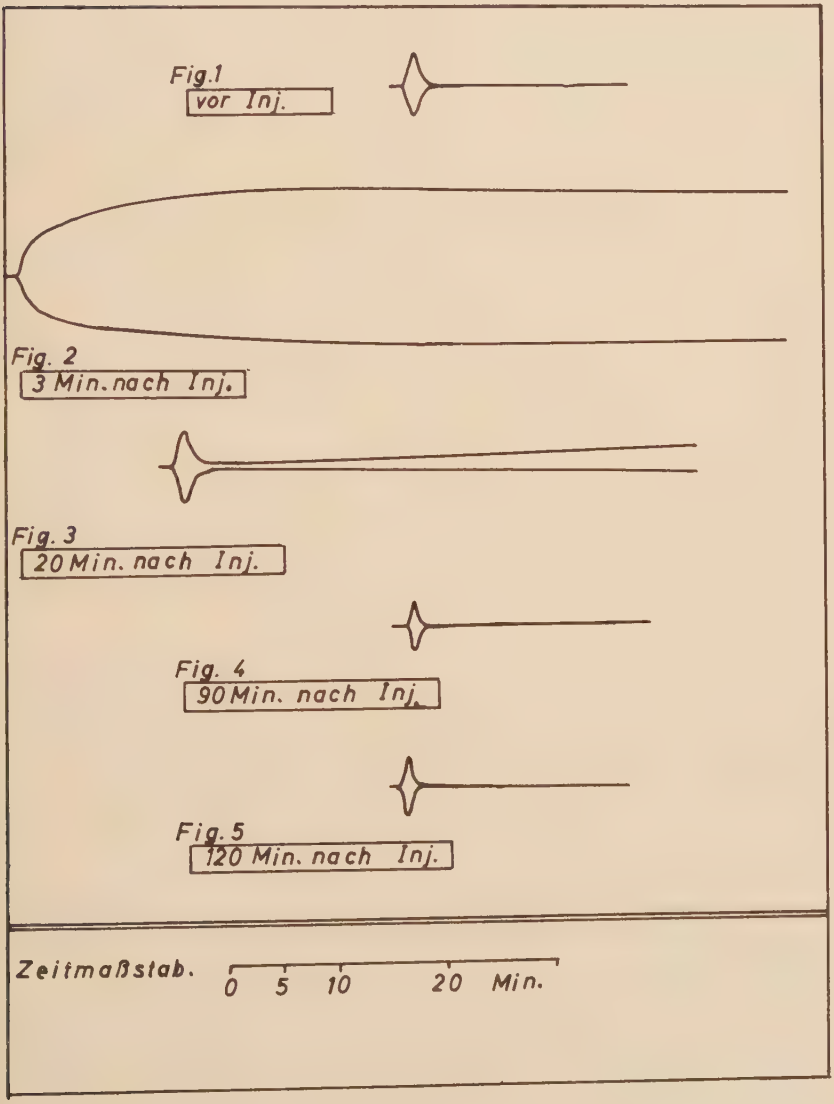
Die abgebildeten TEG-Figuren sind im Hunde - (TEG-P_{16}SF) gewonnen, wobei Plasmen vor und in zunehmenden Zeitabständen nach intravenöser Organinhibitoreninjektion (50 000 K.I.Einh.) beim Hund verwendet wurden.

Ansatz: Hunde - (TEG-P_{16}SF)

0,05 ccm $CaCl_2$-Lösung 1,29 %
0,06 ccm phys. Kochsalzlsg.
0,04 ccm Hundeserum 1:1
0,05 ccm SK-Lösung 2,50 SK-Einh./ccm
0,16 ccm Hundecitratplasma 1:5

Es zeigt sich, dass bereits 20 Minuten nach der Inhibitoreninjektion der TEG-Ablauf weitgehend dem Leerwert entspricht.

Abb.18 zeigt in TEG-Pausen den Wirkungsabfall von Organinhibitor (Trasylol) in vivo am Hund. (Nachgewiesen im [Hunde] - TEG - P_{16} SF mit 12,5 SK.-Einh./Ans.)



Es wurde versucht, die rasche Inaktivierung der Inhibitoren in vivo nicht nur im Tier- und Misch-PSVF sondern auch im Nativblut-(TEG) nachzuweisen.

Zeigten die Inhibitoren 20 bis 40 Minuten nach ihrer intravenösen Injektion keine Wirkung mehr, so war im Gegensatz dazu die durch SK-induzierte Hyperfibrinolyse (16 000 SK-Einh.) länger (etwa 60 Minuten) gut nachweisbar.

Spritzt man Proteolytikum und Inhibitor schnell hintereinander, so müßte etwa 20 - 30 Minuten nach Injektion, wenn also die Inhibitoren nahezu inaktiviert sind, die Lysisintensität vorübergehend zunehmen. Voraussetzung hierfür ist, dass die Fibrinolysevorgänge in vivo von den Inhibitoren nicht irreversibel verändert werden.

Wie die Abbildungen 19, 20, 21 zeigen, konnte in der Tat eine Zunahme der Fibrinolyseintensität einige Zeit nach der Inhibitoreninjektion im Nativblut - TEG nachgewiesen werden. (s. Abb. 19, Fig. 4, 5; Abb. 20, Fig. 5, 6; Abb. 21, Fig. 4)

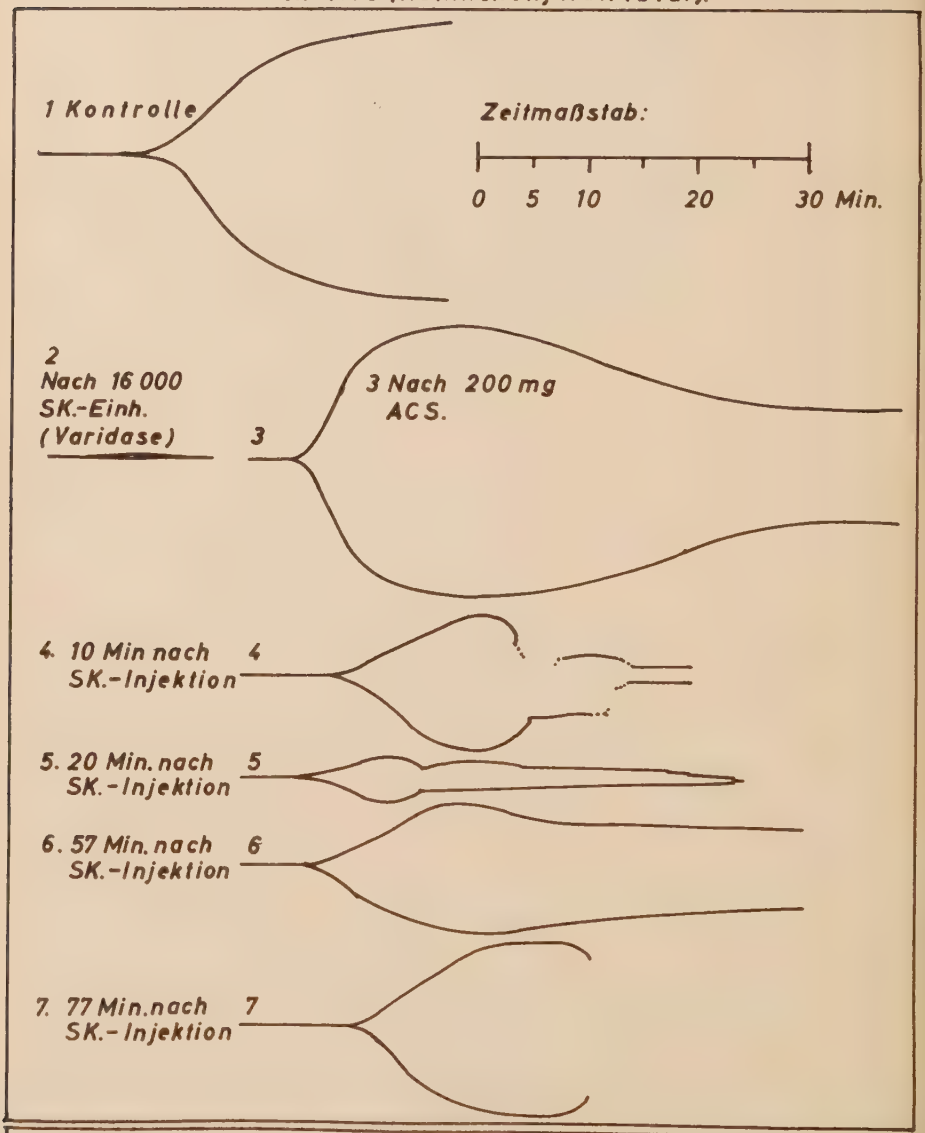
Aus den Abbildungen 19, 20 geht weiterhin hervor, dass etwa 200 mg ACS knapp, 10 000 K.I.Einh. Organinhibitor dagegen gut ausreichen, um die durch 16 000 SK-Einh. (Varidase) in vivo induzierte Fibrinolyse aufzuheben. Vergleicht man, soweit das bei der geringen Zahl der Versuche möglich ist, die Mengen der einzelnen Inhibitoren, die im Nativblut-TEG und im PSVF eine weitgehende Aufhebung der induzierten Fibrinolyse bewirken, so ergibt sich folgendes:
25 mg ACS waren im PSVF etwa 12,5 K.I.Einh. Organinhibitor wirkungsmäßig gleichwertig.
Im Kaninchenversuch bei intravenöser Injektion wirkt aber das 8 000-fache dieser ACS-Menge (= 200 mg) etwa gleichstark wie das 800-fache der Organinhibitorenmenge (= 10 000

K.I.Einh.). ACS ist im Kaninchenversuch im Vergleich zum PSVF etwa 10 mal schwächer wirksam als der Organinhibitor, wobei die Ergebnisse zu Gunsten von ACS gedeutet warden.

Die Frage, ob diese etwa zehnmal schwächere ACS-Wirkung beim Kaninchen auf einer geringeren Aktivierbarkeit eines bluteigenen Inhibitoren-Systems durch ACS, oder auf einer gegenüber diesem Inhibitor stärkeren Abbaupotenz des tierischen Organismus beruht, muß offen bleiben.

Abb.19 TEG-Pausen:

Aufhebung der SK.-Hyperfibrinolyse durch ε-Amino-n-Capronsäure in vivo (Kaninchen, Nativblut).



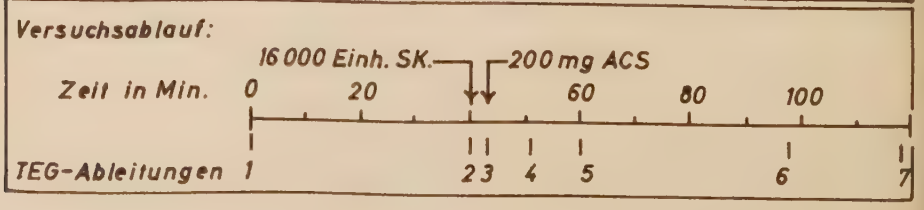


Abb.20 TEG-Pausen:

Aufhebung der SK.-Hyperfibrinolyse durch Organinhibitor (Trasylol) in vivo (Kaninchen, Nativblut).

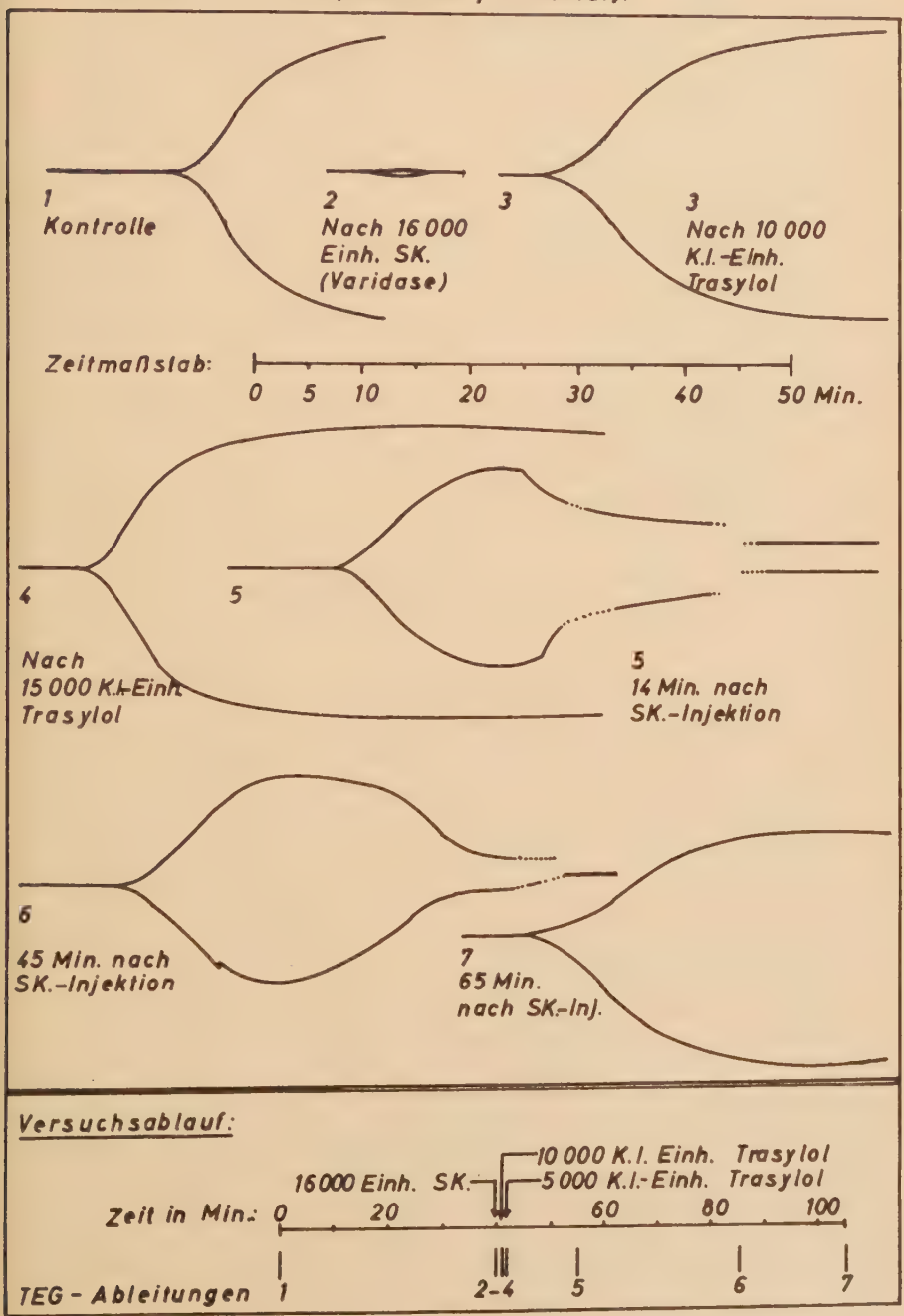
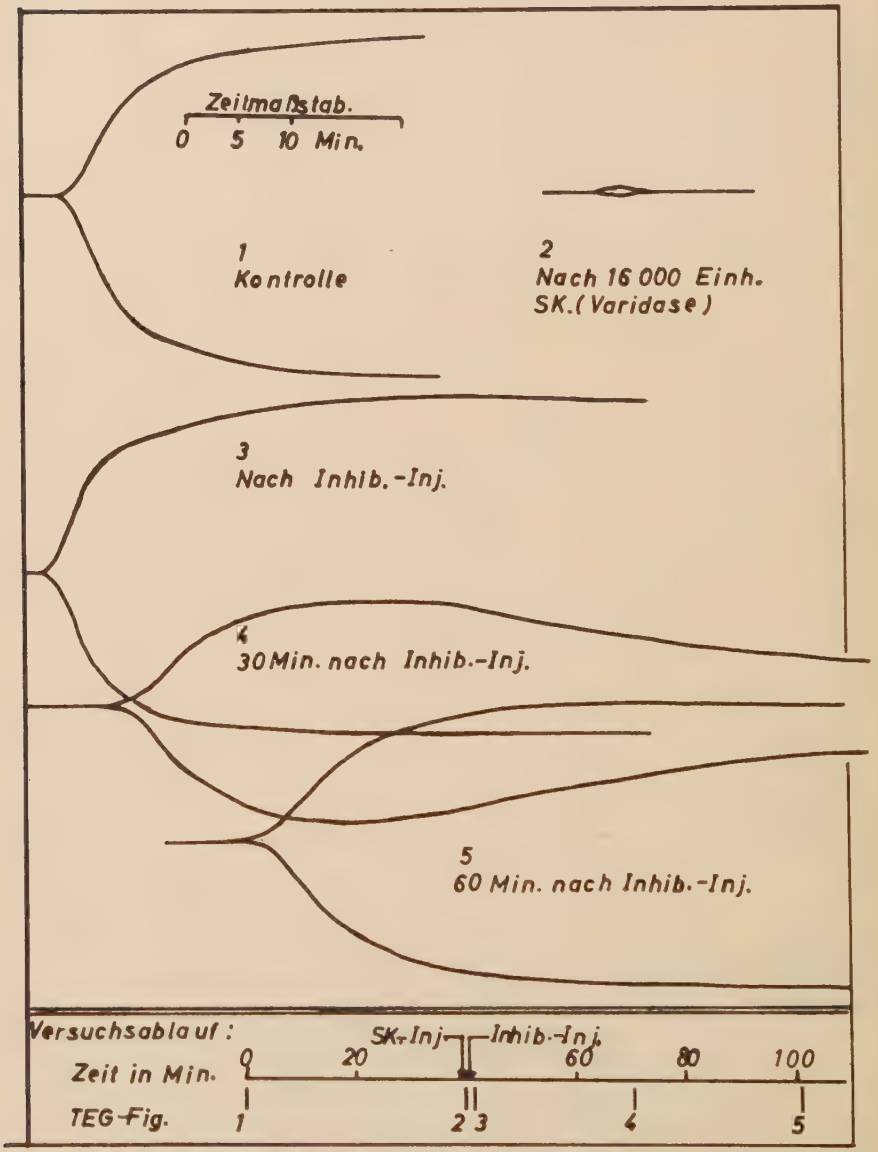


Abb.21 zeigt in TEG-Pausen die Aufhebung der SK-Hyperfibrinolyse durch Inhibitorenmischung (100 mg ACS + 6000 K.I.-Einh. Organinh.) in vivo (Kaninchen, Nativblut)



Diskussion

Bei der vergleichenden Betrachtung von Epsilon-Amino-n-Capronsäure (ACS) und Organinhibitoren (Trasylol; Lungeninhibitor) fiel die unterschiedliche ACS-Wirksamkeit in den angewandten Testen auf. In plasmahaltigen Ansätzen war der Inhibitoreneffekt gut, in Testen bei Verwendung gereinigten Fibrinogens (Euglobulinniederschlag, gereinigtes Human- bzw. Rinder-fibrinogen) dagegen minimal.

Die Annahme, dass bei der Herstellung dieser gereinigten Fibrinogenpräparate ein plasmaeigener Faktor, der für die gute ACS-Wirkung im PSVF und in vivo verantwortlich ist, verlorengeht, konnte bestätigt werden, da unter Serumzusatz zu den Testen, ausgeführt mit gereinigtem Fibrinogen, die ACS-Wirksamkeit zunahm.
Dieser plasmaeigene Faktor fand sich in Nativblut, Citratplasma und Serum, nicht dagegen in gereinigten Fibrinogenpräparaten, im Euglobulinniederschlag und in gereinigtem Humanalbumin (Behringwerke); er erwies sich bei Erwärmen auf 60° C über 120 Minuten als stabil, während bei höheren Temperaturen (75°, 85° und 100° C) ein deutlicher Wirkungsabfall eintrat.
Ob dieser Plasma-Faktor mit einem der beiden plasmaeigenen Antiplasmine (Lit. 4), dem Alpha 1 = Progressiv-antiplasmin und dem Alpha 2 = Sofort-antiplasmin, identisch ist, kann nicht entschieden werden. Die Tatsache, dass diese beiden Antiplasmine, besonders das Progressiv-antiplasmin, bei 60° C innerhalb 40 Minuten einen starken Aktivitätsverlust aufweisen, scheint gegen eine solche Identität zu sprechen.

Die angewandten Methoden waren nicht in der Lage, den Angriffspunkt der Inhibitoren (ACS und Organinhibitoren)

innerhalb der Plasmin-aktivierungsreihe (Proactivator + Lysokinasen - Aktivator; Aktivator + Plasminogen - Plasmin) festzulegen.

Die unterschiedliche Wirksamkeit auf die Fibrinogenolyse, die Addition der Inhibitoren im Sinne einer Superaddition und die Abhängigkeit der ACS-Wirkung von einem Plasmafaktor lassen die Annahme eines unterschiedlichen Wirkungsmechanismus für die verschiedenen Inhibitoren zu.

In therapeutischer Hinsicht erscheint als Ergebnis wichtig:

1) die antifibrinolytische Heparin(oid)-Wirkung,

2) die gesteigerte Wirksamkeit von Inhibitorenmischung gegenüber vergleichbarer Mengen reiner Inhibitoren,

3) die schnelle Inaktivierung der Inhibitoren in vivo.

Bei kombinierter Anwendung von Fibrinolytika und Antikoagulantien, z. B. Thrombose-behandlung, wird die antifibrinolytische Heparin(oid)-Wirkung bei der Dosierung der Fibrinolytika berücksichtigt werden müssen.

Bei der therapeutischen Anwendung von Fibrinolyseinhibitoren erscheint die Kombination von Epsilon-amino-n-Capronsäure (ACS) und Organinhibitoren aus toxikologischen und aus Gründen der Wirksamkeit am günstigsten. Gewisse Schwierigkeiten dagegen wird die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Inhibitorenwirkung in der Blutbahn machen, vorausgesetzt, dass beim Menschen die Inaktivierung ebenso schnell erfolgt wie im Tier.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen wurden in verschiedenen Fibrinolysetesten (Recalcifizierungs-Visueller-Fibrinolysetest, PSVF und FTF), im Thrombelastogramm und in vivo (Kaninchen, Hund) durchgeführt.

Nach Versuchen zum Aussagewert und zur Fehlerbreite der einzelnen Teste, wurden Epsilon-Amino-n-Capronsäure (ACS) und Kallikrein-Inaktivatoren (Organinhibitoren) aus tierischen Drüsen (Trasylol) oder Lungengewebe (Lungeninhibitor) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf streptokinase- oder plasmin-induzierte Hyperfibrinolyse untersucht. Es konnte folgendes festgestellt werden:

1) Eine signifikante Beeinflussung der Gerinnungsvorgänge durch die Inhibitoren ist nicht feststellbar.

2) Die antifibrinolytische Wirksamkeit von ACS und Organinhibitoren in vitro und in vivo wird bestätigt.

3) ACS zeigt im Gegensatz zu den Organinhibitoren in den einzelnen Testen unterschiedliche Wirksamkeit. Verantwortlich für diese ACS-Wirkungsunterschiede ist ein plasmaeigener Faktor. Dieser ist im PSVF und Recalcifizierungs-Visuellen-Fibrinolysetest enthalten, fehlt aber weitgehend im FTF und im Euglobulinlysistest.

4) Die Fibrinolyse-inhibitoren ACS und Organinhibitor (Trasylol) zeigen als Mischung eine gesteigerte Wirksamkeit gegenüber vergleichbaren Mengen reiner Inhibitoren.

5) Die fibrinogenolysehemmende Aktivität von ACS ist gegenüber derjenigen der Organinhibitoren geringfügig.

6) Die antifibrinolytische Wirkung von Antikoagulantien (Heparin und Heparinoid) wird in den verwendeten Testen in vitro und im Tierversuch bestätigt. Dieser Effekt verstärkt die Wirkung gleichzeitig zugesetzter Inhibitoren (ACS; Organinhibitoren).

7) Hohe Organinhibitoren-konzentrationen im Ansatz beeinträchtigen die antikoagulatorische Wirkung von Heparin(oid)-Substanzen.

8) Im Tierversuch (Kaninchen und Hund) wird die Inhibitorenwirksamkeit von ACS auf SK-Hyperfibrinolyse bestätigt, und die von Organinhibitoren beobachtet. 200 mg ACS oder 10 000 K.I.Einh. Organinhibitor reichten bei intravenöser Injektion aus, um die durch 16 000 SK-Einh. (Varidase) bewirkte Hyperfibrinolyse vorübergehend aufzuheben.

9) Ein rascher Wirkungsabfall der Inhibitoren in der Blutbahn des Versuchstieres (Kaninchen oder Hund) kann nachgewiesen werden. 20 - 40 Minuten nach einmaliger intravenöser Inhibitoreninjektion tritt nahezu völliger Wirkungsverlust ein.

Abkürzungen

A) Substanzen

ACS	= Epsilon-Amino-n-Capronsäure
K.I.Einh.	= Kallikrein-Inaktivatoren-Einheit. (S. 4 Organinhibitoren)
Plasma	= Human-citrat-mischplasma (S. 11)
Serum 1:1	= Serum, hergestellt aus 1 Teil Citrat-mischplasma + 1 Teil $CaCl_2$ mol/40
SK	= Streptokinase

B) Methoden

fl	= flockiger Zerfall (S. 9)
gr	= vor Zahlen bedeutet: "größer als"
kl	= vor Zahlen bedeutet: "kleiner als"
FTF	= Fibrinogen-Thrombin-(Visueller)-Fibrinolysetest (S. 12)
PSVF	= Plasma-Serum-Visueller-Fibrinolysetest (S. 12)
Misch-PSVF	= (S. 12)
Tier-PSVF	= (S. 12)
TEG	= Thrombelastogramm (S. 14 ff.)
TEG-P_{16}SF	= (S. 14: TEG-Ansätze)

C) TEG-Größen (S. 17 ff.)

a	= Amplitude
max. a	= maximale Amplitude
E	= Einfüllzeit
K	= Zeitspanne von Abschluss von R bis zu a = 20 mm

$K_{(Lys.tot.)}$ = Zeitspanne von Abschluss von R bis zur völligen Gerinnselauflösung

R = Reaktionszeit

V_a = Maximale-Amplituden-Abnahmegeschwindigkeit (S. 18)

Literaturverzeichnis

1. Astrup,T. Fibrinolysis in Organisme. Blood XI,Nr 9, 781 (1956)

2. Fonio,A. Über die fibrinolytischen Vorgänge und ihre Auswirkung in klinischer Hinsicht. Medizinische 40 , 1563 (1958)

3. Sherry,S. Fletcher,A. Alkjaersig,N. Fibrinolysis and Fibrinolytic Activity in Man. Physiol. Rev. Vol.39 Ap.Nr.2 , 343 (1959)

4. Norman,Ph.S. Studies of the Plasmin System. III. Physical Properties of the two Plasmin-Inhibitors in Plasma. J.Exp. Med. 108, 641 (1958)

5. Werle,E. Tauber,K. Hartenbach,W. Forell,M.M. Zur Frage der Therapie der Pankreatitis. Münch.med. Woch. 100 , 1265 (1958)

6. Tuller,M.A. Amniotic Fluid Embolism, Afibrinogenemia and Disseminated Fibrinthrombosis. (Case Report and Review of the Literature) Amer. Obstetr. Gynecol. 73, 273 (1957)

7. Koutsky,K. Hladovec,J. Padovec.J. Mansfeld,V. Über die antifibrinolytische Wirkung eines aus Pankreas gewonnenen ,sublingual applizierten Inhibitors. Gynaecologia Separ.Vol.Nr.6 148, Dez. (1959)

8. Henson, J. C. Peers W. Tagnon H. J. A New Diagnostic and Therapeutic Approach on Fibrinolysis and Hemorrhage. Blood 13, 874 (1958)

9. Lombardo, L. J. Fibrinolysis in Surgical and Non-surgical Patients. J. int. Coll. Surg. Vol. 30, No 4, 412 (1958)

10. Alkjaersig, N. Fletcher, A. Sherry, S. Epsilon-Amino-Caproic-Acid: An Inhibitor of Plasminogen-Activation. J. biol. Chemistry Vol. 234, 832 (1959)

11. Sherry, S. Lindemeyer, R. Fletcher, A. Alkjaersig, N. Studies on Enhanced Fibrinolytic Activity in Man. J. clin. Invest. Vol 38, 811 (1959)

12. Ablondi, F. B. De Renzo, E. C. Hutchings, B. L. Mechanisme of Clot Lysis by Streptokinase and Effect of Epsilon-Amino-Caproic-Acid. Proc. Soc. exp. Biol. Med. Vol 102, 717 (1959)

13. Alkjaersig, N. Fletcher, A. Sherry, S. The Mechanisme of Clot Dissolution by Plasmin J. clin. Invest. Vol. 38, 1086 (1959)

14. Miller, J. M. Robinson, D. R. Jackson, A. D. Collier C. S. Reversal by Ipsilon of Lytic System in Blood Stream Produced in Rabbits by Streptokinase. AMA Arch. Surgery 78, 33 (1959)

15. Werle,E. Appel,W. Isolierung eines natürlichen Inaktivators für Kallikrein und einige Proteinasen aus Rinderleber. Naturw. 45, 60 (1958)

16. Kraut,H. Körbel-Enkhardt,R. Festschrift E.K.Frey Thieme-Verlag Stuttgart 1958.
Das Verhalten des Kallikrein-Inaktivators aus Rinderparotis gegenüber proteolytischen Fermenten.

17. Marx,R.Clemente,P. Werle,E. Appel,W. Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombotherapie mit Fibrinolytika. Blut Vol.V, 367 (1959)

18. Kowalski,E. Kopec,M. Niewiarowski,S. An Evaluation of the Euglobulin-Method for the Determination of Fibrinolysis. J.clin.Pathol. Vol.12 Nr,3 , 213 (1959)

19. Marx,R. Habilitationsschrift. Haemostaseologie S. 341-358 (1953)

20. v. Kaulla,K.N. Swan,H. v.Kaulla,E.
Beobachtungen an Gerinnung und Fibrinolyse während chirurgischer Eingriffe am menschlichen Herzen in Unterkühlung oder mittels extrakorporaler Kreislauf.
Klin.Wschr. 36, 1053 (1958)

21. v. Kaulla,K.N. Swan,H. Clotting Deviations in Man during Cardiac Bypass : Fibrinolysis and Circulating Antikoagulant.
J.Thoracic Surgery St. Louis .
Vol. 36 Nr. 4 , 519 (1958)

22. Sandritter, W. Huppert, M. Schlüter, G. Zur Frage der Fibrinolyse an experimentellen Gerinnungs- und Abscheidungsthromben. Klin. Wschr. 36, 651 (1958)

23. Koller, F. Siegenthaler, W. Mesenterialvenenthrombose, geheilt durch Antikoagulantien. Schweiz. med. Wschr. 83, 18 (1953)

24. Halse, T. Das Fibrinolytische Potential (II) Enzymologie, Pathologie und Klinik. Medizinische Nr. 51, 2102 (1958)

25. Hofman, H. E. Dissertationsschrift
Zur Kenntnis des Antithrombotikums Heparinoid (G 31 150)
München, Med. F. Diss. v. 29.Juli 1959

26. Ferguson, H. J. Assay of Tryptases by Lysis of Fibrinogen. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 52, 243 (1943)

27. Ablondi, F. B. Hagon, J. Philips, M. De Renzo E. C. Inhibition of Plasmin, Trypsin and Streptokinaseactivated Fibrinolytic System by Epsilon-Amino-Caproic-Acid. Arch. Biochem. u. Biophysics 82, 153 (1959)

28. Thomas, K. Stadler, K. Stegemann, H. Stoffwechselversuch mit Epsilon-Amino-Capronsäure. Hoppe-Seyler's physiol. Chem. 317, 276 (1959)

29. Kraut, H. Körbel, W. Scholtan, W. Schultz, F.
Versuche zur Isolierung des Kallikrein-Inaktivators, III. Elektrophoretische Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung in der Ultrazentrifuge.
Hoppe-Seyler's- Z. physiol. Chem. 321, 90 (1960)

30. Marx. R. Diskussionsbeitrag. 2. +. 3. Symposium d. Deutsch. Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung.
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica Vol. II,6 (1958)

Herrn Professor Dr. R. Marx möchte ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für seine großzügige Hilfe und freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche meinen herzlichsten Dank sagen.

Für die Überlassung von Lungeninhibitor und für die Durchführung der Hundeversuche bin ich Herrn Professor Dr. Dr. E. Werle und seinen Mitarbeitern sehr verbunden.

Herrn Professor Dr. H. Schwiegk danke ich für die Übernahme des Co-Referates.

Lebenslauf

Am 26.Februar 1937 wurde ich, Klaus Gerhard Hennig, als zweites Kind des Chemikers Dr. Theodor Hennig und seiner Ehefrau Gertraude Hennig , geb. Körner , in Greiz,Thüringen, geboren.

Nach 6-jährigem Volksschulbesuch in Greiz trat ich im Frühjahr 1949 in das Städtische Neusprachliche Gymnasium in Oberlahnstein ein,wo ich im Frühjahr 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Das Medizinstudium nahm ich im Sommersemester 1956 an der Universität Bonn auf und bestand dort im Sommer 1958 die ärztliche Vorprüfung.
Ab Wintersemester 1958 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und schloss mein Medizinstudium am 13.6.1962 mit dem Staatsexamen ab.